

ESTUDIO QUÍMICO DE LOS ALCALOIDES PRESENTES EN LAS HOJAS DE
YERBAMORA (*Solanum nigrum* L.), ORIGINARIA DE LOS MUNICIPIOS DE
PASTO Y CHACHAGÜÍ.

LUIS FELIPE ARTURO PERDOMO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2017

ESTUDIO QUÍMICO DE LOS ALCALOIDES PRESENTES EN LAS HOJAS DE
YERBAMORA (*Solanum nigrum L.*), ORIGINARIA DE LOS MUNICIPIOS DE
PASTO Y CHACHAGÜÍ.

LUIS FELIPE ARTURO PERDOMO

Trabajo de grado presentado al comité curricular y de investigación del
departamento de química como requisito parcial para optar el título de químico

DIRECTOR:
OLGA LUCIA BENAVIDES CALVACHE
Magister en ciencias agrarias.

CO-DIRECTOR:
DAVID EDUARDO ARTURO
Químico.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2017.

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva del autor”.

Artículo 1° del acuerdo No 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

OLGA LUCÍA BENAVIDES

Directora

DAVID ARTURO PERDOMO

Co-director

WILLIAM HIDALGO

Jurado

JUAN PABLO JIMÉNEZ

Jurado

San Juan de Pasto, Febrero de 2017.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Cromatografía, principalmente al Químico David Arturo por ser la persona que propuso la idea para el presente trabajo de investigación, por compartir su conocimiento, sus invaluable enseñanzas; por su paciencia y por su vital colaboración en la ejecución de la investigación.

Al grupo de investigación Biotecnología agroindustrial y ambiental, principalmente a la profesora Olga Lucía Benavides por su valiosa colaboración y la acogida brindada a mi persona en su grupo de investigación.

A los químicos Juan Pablo Jiménez y William Hidalgo por su colaboración en la evaluación de este trabajo y por enriquecerlo con sus aportes.

A los Doctores Elena Ibañez Ezequiel, Alejandro Cifuentes y Lidia Montero del laboratorio FOODOMICS del instituto de investigación en ciencias de la alimentación CIAL-CSIC de la Universidad Autónoma de Madrid, por abrir las puertas a esta investigación al proporcionar su apreciado apoyo.

A la química Diana María Gómez por su grata colaboración, por su entrega y su carisma, por el apoyo incondicional prestado.

Al Herbario de investigaciones -Herbario PSO- de la Universidad de Nariño, especialmente a la Botánica Alejandra Narvaez por su valiosa colaboración en la identificación taxonómica de las variedades de *solanum nigrum*.

A la sección de laboratorios especializados de la Universidad de Nariño, especialmente a la preciada colaboración de Sandra Espinoza para el desarrollo del proyecto de investigación.

A la Universidad de Nariño, el departamento de Química, el personal docente y todas aquellas personas que han contribuido directa e indirectamente a mi formación profesional.

A mi Padre y mi Madre, mis hermanos; el núcleo familiar quién me ha educado para ser una persona íntegra, por todo el amor brindado. A mis amigos por su constante compañía y apoyo.

DEDICATORIA

A mi madre Mariana Perdomo por su amor incondicional, por su paciencia y cariño brindado, por haberme dado la vida y luchar por mí, por ser una excelente madre.

A mi padre Luis Eduardo Arturo por ser sustento y pilar de nuestra familia, por brindarme lo necesario para lograr esta meta, por ser un gran padre. Gracias por todo.

A mis hermanos Lucía, Alberto, Elizabeth y David por su apoyo, por enseñarme a compartir, por ser modelo a seguir, maestros en la vida; por su gran cariño. Por todos los momentos vividos que me han hecho feliz, este logro es por ustedes.

A mis amigos, especialmente a Lorena, Pablo, Alfredo, Sebastian y Richard por su amistad. A Lizeth por su cariño y brindarme inspiración.

RESUMEN

Se evaluaron tres métodos de extracción de alcaloides en las hojas de variedades de yerbamora (*Solanum nigrum* L.) provenientes de los municipios de Obonuco y Chachagüí, encontrando que el método más adecuado de extracción fue la hidrólisis ácida en comparación a los métodos de extracción asistida por ultrasonido e hidrólisis básica respecto al número de alcaloides extraídos y a su concentración. Se evaluaron las condiciones óptimas de extracción de alcaloides de las hojas de yerbamora por hidrólisis ácida encontrando las condiciones óptimas de extracción 8 horas de reflujo a 78 °C empleando ácido sulfúrico etanolizado a una concentración 2 molar.

Mediante técnicas cromatográficas se identificaron los principales alcaloides presentes en las hojas de las dos variedades de yerbamora. Empleando GC-MS se identificaron los alcaloides de los extractos encontrando 21 alcaloides para la variedad proveniente de Chachagüí y 25 alcaloides para la variedad proveniente de Obonuco; los alcaloides presentes en ambas variedades fueron en total 16 entre los cuales figuran como mayoritarios la ergocriptina, ciclo(L-leucil-L-prolil), derivados de dicetopiperazinas y derivados de las feniletilaminas. Como alcaloides no volátiles se encontraron derivados de la tiramina y la triptamina.

Realizando el análisis por HPLC-PDA se identificaron las principales familias de alcaloides mediante la comparación de espectros UV-Vis con la literatura, encontrando que los extractos presentan los grupos de alcaloides esteroidales, indólicos, quinolinas, isoquinolinas, quinolonas y derivados de las piridinas. Complementariamente se realizó un análisis por LC-MS/MS el cual reveló la presencia de 10 alcaloides entre los cuales destacan la ergocriptina, ergotamina, hipaconitina, cinchonina y el alcaloide esteroide solasodina.

La comparación de las dos variedades de yerbamora por GC-MS indica que la mayor concentración de alcaloides similares se encuentra en la variedad proveniente de Obonuco, encontrando una concentración de alcaloides de 0,441 mg/g mientras que en Chachagüí se encontró una concentración de 0,158 mg/g, estos valores se pueden atribuir a las condiciones ambientales de las zonas de recolección, condiciones climáticas, entre otros factores.

Palabras clave: Yerbamora (*Solanum nigrum* L.), extracción ácida, alcaloides, metodología de superficie de respuestas, técnicas cromatográficas.

ABSTRACT

Three methods for alkaloids extraction were evaluated in two varieties of Black nightshade's leaves (*Solanum nigrum* L.). These plants were collected from two municipalities: Obonuco and Chachagüí. It was found that the best extraction method was acid hydrolysis in comparison with the other two methods: ultrasound assisted extraction and basic hydrolysis according to the number of extracted alkaloids and their concentration. The optimal conditions of the alkaloids extraction from Black nightshade's leaves were performed by acid hydrolysis finding that the best hydrolysis time is 8 hours reflux at 70 °C using sulfuric acid with ethanol at 2 molar concentration.

Using chromatographic techniques the main alkaloids were identified from the leaves of the two black nightshade varieties. The GS-MS spectrometry technique allowed the identification of alkaloids from extracts, finding 21 alkaloids from the variety from Chachagüí and 25 alkaloids from the one from Obonuco. In total, 16 alkaloids were present in both plants finding mainly: ergocryptine, cycle (L-leucyl-L-prolyl), diketopiperazines derivatives and phenylethylamine derivatives. Among the non-volatile alkaloids were found tyramine and tryptamine derivatives.

The HPLC-PDA analysis allowed the identification of the major groups of alkaloids by comparing UV-Vis spectra with those reported in the literature. It emerged that the extracts contain steroidal alkaloids, indole, quinolines, isoquinolines, quinolones and derivatives pyridines chemical groups; this analysis was performed as a complementary support of the GC-MS analysis.

In addition, an analysis by LC-MS/MS was carried out revealing the presence of 10 alkaloids including ergocryptine, ergotamine, hyphaconitine, cinchonine and the solasodine steroidal alkaloid.

Comparing the two varieties of black nightshade by GC-MS showed that the highest concentration of similar alkaloids is found in the variety from Obonuco, with a 0,441 mg/g concentration value of alkaloids; while in Chachagüí's one the value is 0,158 mg/g concentration. These values can be attributed to environmental conditions of harvesting areas, weather conditions, among some other factors.

Keywords: Black Nightshade (*Solanum nigrum* L.), acid hydrolysis extraction, alkaloids, Response surface methodology, chromatographic techniques.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	21
1. OBJETIVOS.....	23
1.1. Objetivo general.....	23
1.2. Objetivos específicos.....	23
2. MARCO TEÓRICO.....	24
2.1. Rol de la etnobotánica y la fitoquímica.....	24
2.2. La yerbamora.....	24
2.3. Los alcaloides.....	26
2.4. Composición química de la yerbamora.....	30
2.4.1. Alcaloides en la yerbamora.....	30
2.5. Técnicas de extracción, purificación y análisis de alcaloides.....	36
2.5.1. Extracción en medio alcalino.....	36
2.5.2. Extracción en medio ácido.....	36
2.5.3. Extracción asistida por ultrasonido.....	36
2.6. Técnicas cromatográficas.....	38
2.6.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	38
2.6.2. Cromatografía líquida de alta resolución HPLC.....	40
2.6.3. Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas LC-MS/MS.....	42
2.7. Diseño experimental.....	43
2.7.1 Tipos de diseño experimental.....	43
2.7.2. Metodología de superficies de respuesta.....	44
2.8. Antecedentes.....	46
3. METODOLOGÍA.....	47
3.1. Recolección de muestras.....	47

3.1.1. Clasificación taxonómica de las muestras.....	48
3.2. Material general de laboratorio y reactivos químicos.....	48
3.2.1. Material general de laboratorio.....	48
3.2.2. Reactivos químicos.....	48
3.3. Tratamiento de las muestras.....	48
3.3.1. Desengrase del material vegetal.....	50
3.4. Evaluación de los métodos de extracción.....	50
3.5. Extracción de alcaloides de yerbamora.....	51
3.5.1. Extracción ácida de alcaloides.....	51
3.5.2. Extracción básica de alcaloides.....	53
3.5.3 Extracción asistida por ultrasonido.....	54
3.6. Diseño experimental.....	55
3.7. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	56
3.8. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC.....	58
3.9. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas LC-MS/MS IT.....	58
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
4.1. Determinación del método de extracción.....	60
4.2. Comparación de los métodos de extracción en muestras vegetales desengrasadas y sin desengrasar.....	63
4.3. Optimización de condiciones de extracción de alcaloides.....	68
4.3.1. Efectos estimados para número de alcaloides.....	68
4.3.2. Efectos estimados para concentración de alcaloides.....	73
4.3.3. Optimización del diseño.....	77
4.4. Análisis de alcaloides de yerbamora por GC-MS.....	80
4.5. Análisis de alcaloides de yerbamora por HPLC-PDA.....	87
4.6. Análisis de alcaloides de la yerbamora por LC-MS/MS.....	99

4.7. Límite de detección, exactitud y precisión de la metodología de alcaloides de la yerbamora por GC-MS.....	102
4.8. Cuantificación de alcaloides presentes en las hojas de yerbamora nativa de obonuco y chachagüí.....	104
4.9. Recopilación de información de los alcaloides identificados en las muestras de yerbamora.....	107
CONCLUSIONES.....	110
RECOMENDACIONES.....	112
BIBLIOGRAFÍA.....	113
ANEXOS.....	122

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Estructuras de las familias de alcaloides más distribuidas en la naturaleza.....	28
Tabla 2. Evaluación de los métodos de extracción para el análisis de alcaloides en yerbamora.....	50
Tabla 3. Diseño experimental de superficie de respuesta: concentración de ácido y tiempo de extracción.....	56
Tabla 4. Gradiente de separación en el análisis HPLC-PDA para el extracto de alcaloides de hojas de yerbamora.....	58
Tabla 5. Número de picos cromatográficos correspondientes a alcaloides obtenidos en los tres tipos de extracción.....	60
Tabla 6. Concentración total de alcaloides comunes en mg/g para los tres métodos de extracción.....	62
Tabla 7. Número de alcaloides en proceso de desengrase y sin desengrasar.....	64
Tabla 8. Concentración total de alcaloides comunes en mg/g para el proceso de desengrase y sin desengrasar.....	65
Tabla 9. Número de picos cromatográficos correspondientes a alcaloides en la optimización de las condiciones de extracción.....	68
Tabla 10. Concentración total de alcaloides por gramos de hojas en la optimización de las condiciones de extracción.....	68
Tabla 11. Efectos estimados para el número de alcaloides.....	69
Tabla 12. Análisis de Varianza para número de alcaloides.....	70
Tabla 13. Coeficientes de regresión para número de alcaloides.....	72
Tabla 14. Efectos estimados para concentración de alcaloides en mg/g.....	73
Tabla 15. Análisis de Varianza para concentración de alcaloides.....	74
Tabla 16. Coeficientes de regresión para concentración de alcaloides.....	76
Tabla 17. Interacciones de factores y efectos en los experimentos.....	77
Tabla 18. Matriz del diseño experimental.....	78
Tabla 19. Optimización de deseabilidad.....	79
Tabla 20. Alcaloides mayoritarios identificados en las hojas de yerbamora	

por GC-MS.....	81
Tabla 21. Alcaloides no volátiles mayoritarios identificados en las hojas de yerbamora por GC-MS.....	86
Tabla 22. Grupos de alcaloides identificados en las hojas de yerbamora originaria de Obonuco y Chachagüí por HPLC-PDA.....	88
Tabla 23. Alcaloides mayoritarios identificados en las hojas de yerbamora por LC-MS/MS.....	100
Tabla 24. Datos de la recta de calibrado del estándar interno para el límite de detección.....	102
Tabla 25. Cuantificación de alcaloides en las hojas de yerbamora por GC-MS...	104
Tabla 26. Repetibilidad del método de extracción.....	105
Tabla 27. Concentración promedio de alcaloides mayoritarios identificados en las hojas de yerbamora por GC-MS.....	106
Tabla 28. Resumen de alcaloides reportados para yerbamora.....	107
Tabla 29. Propiedades referenciadas de alcaloides.....	108

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Flores, frutos y hojas de la yerbamora.....	25
Figura 2. Representación de los alcaloides en forma de aminas base y su sal.....	29
Figura 3. Alcaloide Higrina, en su forma base y sal.....	29
Figura 4. Estructura de la diosgenina, solasodina y el acetato de deshidropregnenolona.....	31
Figura 5. Mecanismo de biosíntesis de la solasodina a partir de colesterol y ácido mevalónico.....	33
Figura 6. Estructura de los oligosacáridos de 2-desoxiazúcares.....	34
Figura 7. Estructuras de la solanidina y solasodina.....	35
Figura 8. Estructuras de los carbohidratos laterales en la solasonina, solamargina y solanidina.....	35
Figura 9. Esquema equipos de EUA.....	37
Figura 10. Esquema de un cromatografo de gases.....	39
Figura 11. Esquema de un cromatógrafo HPLC.....	41
Figura 12. Diagrama de la espectrometría de masas Tandem.	42
Figura 13. Diagrama general de la metodología.....	47
Figura 14. Secado de hojas en papel periódico.....	49
Figura 15. Molienda de hojas en el minimolino.....	49
Figura 16. Sistema de reflujo en medio ácido.....	51
Figura 17. Rotaevaporación de un extracto.....	52
Figura 18. Agitación magnética en la extracción básica.....	53
Figura 19. Baño ultrasónico Fisher FS20H.....	54
Figura 20. Cromatógrafo de gases-masas Shimadzu GC-MS QP2010.....	57
Figura 21. Bloque térmico de temperatura ajustable Eyela MG-2200.....	57
Figura 22. Emulsión formada en el proceso de extracción sin desengrasar.....	67
Figura 23. Cromatogramas TIC GC-MS de alcaloides en variedades de ym de Obonuco (superior) y Chachagüí (inferior).....	80

Figura 24. Espectro de masas de la Ergocriptina.....	82
Figura 25. Estructura general de los alcaloides tipo ergot.....	82
Figura 26. Fragmentación de masas de la Ergocriptina.....	83
Figura 27. Espectro de masas del Ciclo(leucil-prolil).....	84
Figura 28. Fragmentación de masas del ciclo(leucil-prolil).....	84
Figura 29. Espectro de masas del BDN.....	85
Figura 30. Espectro de masas de 5-metil-2-pirrolidinona.....	85
Figura 31. Fragmentaciones de 5-metil-2-pirrolidinona.....	85
Figura 32. Reacción de derivatización con MSTFA.....	86
Figura 33. Espectro de masas de la triptamina.....	87
Figura 34. Espectro de masas de 1H-Indol-3-acetamida.....	87
Figura 35. Cromatograma HPLC-PDA a $\lambda = 208$ nm.....	89
Figura 36. Espectros UV-Vis de los alcaloides esteroidales y su desplazamiento batocrómico.....	90
Figura 37. Espectro UV-Vis ($\lambda = 208$ nm) del alcaloide 7.....	90
Figura 38. Estructuras resonantes de la quinolína.....	91
Figura 39. Espectro UV-Vis de las quinolinas.....	91
Figura 40. Espectro UV-Vis ($\lambda = 254$ nm) del alcaloide 11.....	92
Figura 41. Espectro UV-Vis de las isoquinolinas (protopinas izquierda y erisodinas derecha).....	92
Figura 42. Espectro UV-Vis ($\lambda = 208$ nm) del alcaloide 9.....	93
Figura 43. Espectro UV-Vis ($\lambda = 294$ nm) del alcaloide 17.....	93
Figura 44. Espectro UV-Vis de las 2-quinolonas (derecha) y 4-quinolonas (izquierda).....	94
Figura 45. Espectro UV-Vis del alcaloide 10.....	94
Figura 46. Espectro UV-Vis del alcaloide 13.....	94
Figura 47. Espectro UV-Vis de los indoles N, 2, 3 sustituidos.....	95
Figura 48. Espectro UV-Vis ($\lambda = 294$ nm) del alcaloide 19.....	96

Figura 49. Espectro UV-Vis de los indoles (ergotamina).....	96
Figura 50. Espectro UV-Vis ($\lambda = 208$ nm) del alcaloide 3.....	97
Figura 51. Espectro UV-Vis de los indoles monoterpénicos.....	97
Figura 52. Espectro UV-Vis ($\lambda = 294$ nm) del alcaloide 14.....	98
Figura 53. Espectro UV-Vis de los alcaloides dihidroindólicos.....	98
Figura 54. Espectro UV-Vis ($\lambda = 208$ nm) del alcaloide 5.....	99
Figura 55. Cromatograma LC-MS/MS ($\lambda = 208$ nm).....	99
Figura 56. Cromatograma LC-MS/MS ($\lambda = 294$ nm).....	100
Figura 57. Comparación de espectros de masas por LC-MS/MS de la solasodina.....	101
Figura 58. Fragmentaciones comunes MS/MS de la solasodina.....	105
Figura 59. Espectro de masas de la cafeína como estándar interno (superior) y teórico (inferior).....	107

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Dispersión por código de nivel para número de alcaloides.....	61
Gráfica 2. Caja y bigotes para número de alcaloides.....	61
Gráfica 3. Dispersión por código de nivel para concentración de alcaloides en mg/g.....	62
Gráfica 4. Caja y bigotes para concentración de alcaloides en mg/g.....	63
Gráfica 5. Dispersión por código de nivel para número de alcaloides en el tratamiento de desengrase.....	64
Gráfica 6. Caja y bigotes para número de alcaloides en el tratamiento de desengrase.....	65
Gráfica 7. Dispersión por código de nivel para concentración de alcaloides en el tratamiento de desengrase.....	66
Gráfica 8. Caja y bigotes de concentración de alcaloides en el tratamiento de desengrase.....	66
Gráfica 9. Diagrama de Pareto estandarizado para la extracción de alcaloides.....	69
Gráfica 10. Efectos principales para número de alcaloides.....	71
Gráfica 11. Superficie de respuesta estimada para número de alcaloides.....	73
Gráfica 12. Diagrama de Pareto estandarizado para la extracción de alcaloides.....	74
Gráfica 13. Efectos principales para concentración de alcaloides.....	75
Gráfica 14. Superficie de respuesta estimada para concentración de alcaloides.....	76
Gráfica 15. Superficie de respuesta estimada para concentración de alcaloides.....	79
Gráfica 16. Recta de calibración de la cafeína.....	103
Gráfica 17. Caja y bigotes de la repetibilidad del método.....	105
Gráfica 18. Comparación de variedades de yerbamora según la concentración de alcaloides en mg/g.....	106

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Identificación taxonómica de yerbamora proveniente de Chachagüí.....	122
Anexo B. Identificación taxonómica de yerbamora proveniente de Obonuco.....	123
Anexo C. Alcaloides totales identificados por GC-MS en hojas de yerbamora originaria de Chachagüí.....	124
Anexo D. Alcaloides totales identificados por GC-MS en hojas de yerbamora originaria de Obonuco.....	125
Anexo E. Estructuras de los alcaloides presentes en las dos variedades de yerbamora.....	126
Anexo F. Cromatogramas: GC-MS y HPLC.....	128
Anexo G. Espectros de masas por GC-MS y LC-MS/MS de los alcaloides presentes en las dos variedades de yerbamora.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Alk	Alcaloide.
ANOVA	Análisis de varianza.
BIOTA	Grupo de investigación biotecnología agroindustrial y ambiental.
CV	Coeficiente de variación.
DAD	Deterctor de arreglo de diodos.
EI	Impacto electrónico (sigla en inglés).
ESI	Interfase electrospray (Sigla en inglés).
EUA	Extracción asistida por ultrasonido (sigla en inglés).
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (sigla en inglés).
GL	Grados de libertad.
HA	Hidrólisis ácida.
HB	Hidrólisis básica.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (sigla en inglés).
HPLC/MS ²	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas.
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar.
MSR	Metodología de superficie de respuesta.
MSTFA	N-Metil-N-(Trimetilsilil) Trifluoroacetamida.
PCA	Análisis de los componentes principales (sigla en inglés).
PDA	Detector de arreglo de diodos (sigla en inglés).
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
RSD	Desviación estándar relativa (sigla en inglés).
TMS	Grupo Trimetilsilil.
Tr	Tiempo de retención.
UV-VIS	Espectrofotometría ultravioleta visible.

GLOSARIO

Analito: Sustancia objeto de estudio para su detección, identificación y/o cuantificación así como sus derivados.

Alcaloide: Metabolito secundario producido por organismos vivos que se caracteriza por presentar el grupo químico amino.

ANOVA: Análisis de varianza estadístico en el cual se comparan más de dos medias entre sí.

Coeficiente de variación: Desviación estándar dividida por la media. Su expresión porcentual es la desviación estándar relativa RSD.

Condiciones de repetibilidad: Condiciones en las que un mismo operador o analista obtiene resultados de ensayos independientes para métodos iguales, con los mismos equipos e idénticas muestras a analizar.

Ensayo: Operación realizada de acuerdo a un determinado procedimiento el cual consiste en determinar cualitativa y/o cuantitativamente las propiedades de un producto o proceso.

Exactitud: Grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia.

Precisión: Nivel de concordancia entre varios resultados de ensayo independientes obtenidos bajo condiciones predeterminadas.

Repetibilidad: Precisión en condiciones de repetibilidad.

Varianza: Medida de dispersión de datos, se define como el cuadrado de la desviación estándar.

INTRODUCCIÓN

El Departamento de Nariño cuenta con una amplia biodiversidad de flora, de la cual hay muchas investigaciones por realizar para encontrar aplicaciones potenciales en diversas áreas de las ciencias. Entre las variedades de flora se encuentra la yerbamora (*Solanum nigrum* L), un sub-arbusto extendido por África, Eurasia y Suramérica cuyo uso terapéutico es muy importante y ampliamente difundido en diversas regiones según información registrada por la etnomedicina. El Departamento de Nariño, específicamente los municipios de Pasto (corregimiento de Obonuco) y Chachagüí cuentan con gran diversidad de la especie *Solanum nigrum* L. ampliamente extendida por dichas regiones.

El uso etnobotánico conocido de la yerbamora comprende los siguientes aspectos: narcótico, analgésico, sedante, antiséptico, sudorífico, estimulante, antineurálgico; atenúa los efectos de neurosis como la epilepsia; también se emplea la infusión por su efecto antiinflamatorio y cicatrizante.¹ Las pasta de hojas se emplea como humectante, emoliente para sanar quemaduras, llagas, úlceras, herpes, entre otros males cutáneos,² mientras que su cocción se emplea contra afecciones gastrointestinales y respiratorias, hipertensión, cirrosis, reumatismo, entre otros males. Estudios recientes indican que los extractos de estos alcaloides presentan actividad neurofarmacéutica probada en ratas, por lo que presenta acción como depresor del sistema nervioso central, lo cual sugiere una aplicación potencial de los extractos como sedantes o somníferos.³

La importancia terapéutica se atribuye a los metabolitos alcaloides esteroideos, indólicos y tropánicos de los cuales se han identificado la solasonina, solamargina, solanina y solamargina y las agliconas solasodina y solanidina como algunos de los componentes de actividad biológica mayoritaria.⁴ Estos hechos, sumados al uso medicinal basado en numerosas fuentes de información etnobotánica que se encuentran en la región, así como la gran variedad de especies sin estudios

¹ Vásquez C., Bernal H. Plantas medicinales en Colombia: Origen, uso tradicional, eficacia, seguridad y aplicabilidad desde el sistema de salud. En: Rutas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia (2011). p. 61-64.

² Jainu M., Shyamala C. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcers models: Possible mechanism for the inhibition of acid formation. En: Journal of Ethnopharmacology (2006). vol. 104, p. 156-163.

³ Perez R., Perez J., Garcia L., Sossa M. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. En: Journal of ethnopharmacology (1998). vol. 62, p. 43-48.

⁴ Huang H., Syu K., LIN J. Chemical composition of *Solanum nigrum* Linn extract and induction of autophagy by leaf water extract and its major flavonoids in AU565 breast cancer cells. En: Journal of Agricultural & Food Chemistry (2010). vol. 58, p. 8699-8708.

químicos que sustenten dicha información justifican el estudio de esta planta, cuya importancia radica en analizar las propiedades y características fitoquímicas de dicha variedad, comparándola con respecto a los perfiles de alcaloides reportados en previos estudios. También hay que tener en cuenta que no hay estudios ni registros de esta especie en la región, por ende es necesario ampliar y comparar el modelo teórico encontrado en la bibliografía, así como complementar estudios anteriores realizados en otros países, para encontrar una aplicación potencial.

Incentivada por realizar un mejor aprovechamiento de la biodiversidad Nariñense, la presente investigación tiene como propósito determinar la composición química y la cuantificación de los alcaloides presentes en las hojas de yerbamora recolectada en Obonuco y Chachagüí.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Determinar los alcaloides en las hojas de yerbamora (*Solanum nigrum L*) recolectadas en los municipios de Pasto y Chachagüi.

1.2. Objetivos específicos

- Extraer los alcaloides esteroidales presentes en las hojas de yerbamora.
- Comparar los métodos de extracción de alcaloides (extracción ácida, alcalina y asistida con ultrasonido) para el análisis de alcaloides en hojas de yerbamora
- Identificar y cuantificar los alcaloides mayoritarios de las hojas de yerbamora (*Solanum nigrum L.*) mediante técnicas cromatográficas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Rol de la etnobotánica y la fitoquímica

La botánica es una ciencia que ofrece alternativas terapéuticas económicas para las regiones que poseen rica biodiversidad. Dentro de las ciencias de la salud existe la medicina naturista que abarca una serie de prácticas y terapias para el tratamiento y prevención de enfermedades empleando el uso de productos naturales; estas prácticas se remontan a los orígenes del hombre y las civilizaciones abarcando lo que se conoce como etnomedicina y etnobotánica las cuales son ramas de ciencias integradas enfocadas hacia la mejora de la salud y la calidad de vida de un grupo o población específica.⁵

Las ciencias exactas como la química, se ven en la obligación de investigar nuevas alternativas para la mejora de la calidad de vida empleando materias amigables con el medio ambiente y que fomenten el desarrollo social, es por razón la importancia de integrar la tradición y la ciencia como una alternativa en la investigación en plantas medicinales.

Relacionando estos aspectos, nace la fitoquímica como una disciplina científica enfocada al aislamiento, purificación, elucidación y caracterización de bioactividad presente en los metabolitos secundarios de los vegetales, la cual tiene aplicación en la industria farmacéutica, alimenticia, de tintes, entre otras.⁶

2.2. La yerbamora

La yerbamora es un subarbusto de la familia de las *solanaceae* (solanácea) cuyo nombre científico es *Solanum nigrum* L. Es nativa de Eurasia e introducida en Suramérica donde se extendió por todo el continente.

Presenta raíces blancuzcas, tallo pubescente (ciliado) ramificado desde aproximadamente la base de la planta, crece hasta 1 metro de altura, presenta hojas alternas lanceoladas de forma ovalada, elíptica y romboidal de 13 cm de longitud por 6 cm de ancho. Sus flores son pequeñas, con cinco pétalos blancos y centro amarillo, agrupadas en

⁵ Chang A. Tradición y ciencia, una alternativa en la investigación de plantas medicinales. En: Etnomedicina y etnobotánica: avances en la investigación. Universidad Andina Simón Bolívar. (2010). p. 13.

⁶ Echeverri F. Búsqueda de sustancias bioactivas de plantas de la flora Colombiana. Estructura, actividad y síntesis. En: Etnomedicina y etnobotánica: avances en la investigación. Universidad Andina Simón Bolívar. (2010). p. 157.

corimbos axilares con 3 a 6 flores en cada corimbo. Su cáliz presenta 5 sépalos, estambres con antenas amarillas. Sus frutos son bayas globosas de aproximadamente 8 mm de diámetro, de color negro al madurar y semillas reniformes. La figura 1 muestra las características físicas de la yerbamora.⁷

Figura 1. Flores, frutos y hojas de la yerbamora.



Fuente: Romero, S. (2002).⁸

Solanum es uno de los más importantes géneros botánicos de la familia Solanaceas el cual comprende 84 géneros y aproximadamente 3000 especies, de la cual *Solanum Nigrum* es la más extendida y la cual presenta más variables de

⁷ Fonnegra R., Jimenéz S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia (2007). vol. 2, p. 272-275.

⁸ Romero S. Recopilación bibliográfica de *Solanum Nigrum*, L. (Yerbamora). Universidad Veracruzana. Facultad de ciencias químicas (2002). p. 19-22.

especie en el género *solanum*.

Este arbusto ha sido investigado por sus diversas propiedades terapéuticas, entre las que destacan: su acción antihistamínica y antialérgica ya que los estudios indican la reducción y eliminación de alergias bloqueando la acción de la histamina, actividad fitoestrogénica estudiada en ratas actuando sobre la función reproductiva de dichos animales,⁹ actividad in-vitro contra el virus de la hepatitis C, tratamiento contra enfermedades inflamatorias intestinales tales como la enfermedad de *Crohn* o la *colitis ulcerosa*,¹⁰ aplicación potencial para el tratamiento del melanoma metastásico, tipo de tumor de tipo cutáneo asociado al cáncer de piel, efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer HepG2 y CT26, carcinoma en hepatocitos y en el colon, tratamiento del cáncer de seno,¹¹ actividad antioxidante y antihiperlipidémica, es decir, actividad característica para reducir la concentración de lípidos en la sangre, particularmente el colesterol y evitar así enfermedades coronarias.¹²

2.3. Los alcaloides

Los alcaloides son metabolitos secundarios de carácter básico los cuales son sintetizados generalmente por aminoácidos o derivados N-heterocíclicos como el pirrol, pirimidina o purina. Los alcaloides se caracterizan por presentar un nitrógeno en un anillo heterocíclico, debido a esto su clasificación es arbitraria ya que no hay una necesidad real en separarlos de las aminas ya que ambos se originan a partir de aminoácidos. Sin embargo existen compuestos químicos que no se consideran alcaloides y son excepciones a la definición química dada anteriormente, las cuales son aminas y amidas que no son básicas, tal como la colchicina o el ácido aristocólcico.¹³

La función de los alcaloides aún no está establecida, sin embargo se sabe que los derivados de la pirimidina y purina cumplen roles importantes en procesos biológicos, existen algunas deducciones acerca del “rol” que desempeñan estos

⁹ Nirmal S., Patel A., Bhawar S., Pattan S. Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: Possible role in the treatment of asthma. En: Journal of ethnopharmacology (2012). vol. 142, p. 91-97.

¹⁰ Rahimi R., Shams M., Abdollahi M. A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for inflammatory bowel disease. En: World Journal of Gastroenterol (2010). vol. 16, p. 4504-4514.

¹¹ Shokrzadeh M., Azadbakht M., Ahangar N., Hashemi A., Saeedi S. Cytotoxicity of hydro-alcoholic extracts of *Cucurbitapepo* and *Solanum nigrum* on HepG2 and CT26 cancer cell lines. En: Pharmacognosy Magazine (2010). vol. 6, p. 176-179.

¹² Arulmozhi V., Krishnaveni M., Karthishwaran K.; Dhamodharan G., Mirunalini S. Antioxidant and antihyperlipidemic effect of *Solanum nigrum* fruit extract on the experimental model against chronic ethanol toxicity. En: Pharmacognosy Magazine (2010). vol. 6, p. 42-50.

¹³ Bilbao M. Análisis fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío, facultad de ciencias básicas y tecnológicas, programa de química de productos vegetales (1997). p. 83-99.

metabolitos en las plantas, tal como su función como productos de desecho o almacenamiento de nitrógeno, transporte de nitrógeno no metabolizado, protección de la planta frente al ataque de depredadores, reguladores de crecimiento, entre otras funciones, sin embargo estos metabolitos son secundarios ya que no son esenciales.

Todos los alcaloides pueden bio-sintetizarse mediante las vías del ácido shikímico, policétidos o el ácido mevalónico en combinación con aminoácidos en diferentes condiciones lo cual da como resultado una alta diversidad de compuestos.¹⁴

Como se mencionó anteriormente, la clasificación de los alcaloides puede ser arbitraria, como por ejemplo la clasificación según sus propiedades farmacológicas se pueden distinguir: los estimulantes nerviosos, los alucinógenos, parasintopatomiméticos (modificadores del sistema nervioso autónomo), parasintopatológicos (modificadores del sistema nervioso central), etc.

También se pueden clasificar de acuerdo a su distribución botánica o a su origen biosintético.

Principalmente se clasifican como alcaloides verdaderos si son derivados de aminoácidos con un anillo heterocíclico; protoalcaloides si son derivados de aminoácidos sin necesidad de presentar un anillo heterocíclico y pseudoalcaloides si no son derivados de aminoácidos sino que son simplemente aminas. Sin embargo la forma correcta de clasificarlos es en función de su estructura:¹⁵

-Alcaloides alifáticos:

- Derivados de la ornitina.
- Derivados de la lisina.

-Alcaloides aromáticos:

- Derivados del ácido nicotínico.
- Derivados de la fenilalanina y tirosina.
- Derivados del triptófano.

-Alcaloides de origen diverso:

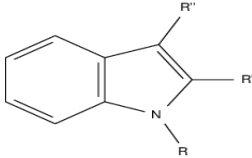
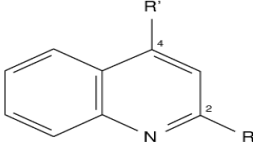
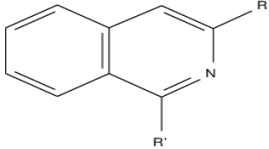
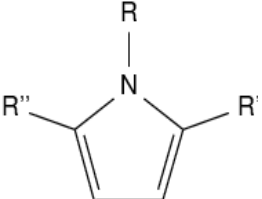
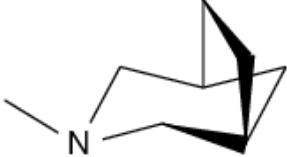
- Alcaloides terpénicos y esteroidales.
- Alcaloides diversos.

La tabla 1 muestra las estructuras de algunas familias más usuales y extensas de alcaloides.

¹⁴ Kurt B., Torssell G. Natural Product chemistry. A mechanistic biosynthetic and ecological approach. En: Apotekarsocieteten (1997). vol. 2, p. 348-390.

¹⁵ Arango G. Alcaloides y compuestos nitrogenados. En: Farmacognosía y fitoquímica. Facultad de química farmacéutica. (2008). p. 13-15.

Tabla 1. Estructuras de las familias de alcaloides más distribuidas en la naturaleza.

Familia de alcaloides	Estructura
Indólicos	
2 y 4 Quinolinas	
Isoquinoleínas	
Pirrólicos	
Tropánicos	

Fuente: Arango G. (2008).¹⁶

En general la biosíntesis de alcaloides depende de un aminoácido, así los alcaloides verdaderos se originan por la condensación de un aminoácido descarboxilado con un anillo heterocíclico, los precursores de estos alcaloides son la L-ornitina, L-lisina, L-tirosina o L-fenilalanina. Los protoalcaloides en cambio, se originan por la condensación de un aminoácido descarboxilado con una cadena que no sea de tipo heterocíclica. En contraste, los pseudoalcaloides cuyo esqueleto no proviene de aminoácidos sino de sus precursores, mediante reacciones de transaminación en diferentes vías sintéticas de los aminoácidos.¹⁷

Algunas de las principales familias de alcaloides derivan de la L-ornitina, que es un importante precursor de alcaloides pirrolidinicos, tropanos y pirrolizidinos; la L-

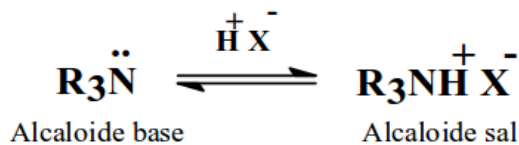
¹⁶ Arango G. (2008). *op, cit.*, p. 19-39.

¹⁷ Aniszewski, T. Alkaloids - secrets of life, alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. En: Elsevier science (2007). p. 73-88.

fenilalanina es un precursor de los protoalcaloides derivados de la feniletilamina y algunos alcaloides tipo ergot (como la ergotamina). La L-tirosina biosintetiza algunos derivados de feniletilaminas y las isoquinolinas; el ácido L-antranílico es precursor de quinazolininas, quinolininas y acridinas mientras que la L-histidina es precursor de alcaloides imidazoles, mientras que la L-Lisina es un precursor de piperidinas, quinolizidinas e indolizinas. Los alcaloides presentes en la yerbamora a menudo son producto de la L-ornitina y el ácido L-nicotínico.¹⁸

Los alcaloides generalmente son incoloros, salvo aquellos que son altamente conjugados como por ejemplo la berberina de coloración amarilla, la sanguinarina color rojo, la urabaína color verde, entre otros; habitualmente son sólidos a temperatura ambiente, aunque las bases no oxigenadas son líquidas.

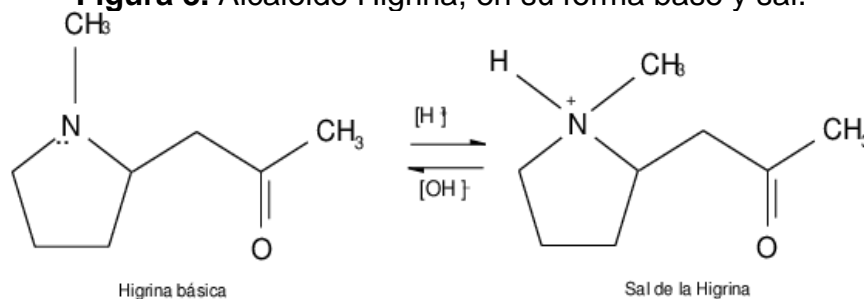
Figura 2. Representación de los alcaloides en forma de aminas base y su sal.



Fuente: Arango G. (2008).¹⁹

Debido al carácter básico de los alcaloides, su solubilidad puede variar en función del pH, en forma básica son solubles en solventes orgánicos apolares tal como el benceno, éter etílico, cloroformo, diclorometano, entre otros; en forma de sales son solubles en solventes polares como el agua, etanol, soluciones ácidas, etc.²⁰ Las figuras 2 y 3 indican la forma protonada de los alcaloides y su forma base.

Figura 3. Alcaloide Higrina, en su forma base y sal.



Fuente: Arango G. (2008).²¹

Por lo tanto, para la extracción de alcaloides hay que tener en cuenta en su carácter básico para la elección de un solvente adecuado, así mismo se puede proceder con la formación de la sal del alcaloide por acción de un ácido mineral

¹⁸ Aniszewski T. (2007). *op, cit.*, p. 122-128

¹⁹ Arango G. (2008). *op, cit.*, p. 8-12.

²⁰ Kurt B. (1997). *op, cit.*, p. 390-402.

²¹ Arango G. (2008). *op, cit.*, p. 8-12.

para que de esta manera, sea soluble en medios polares. Para la adecuada extracción de los alcaloides es necesario tener en cuenta que las hojas de las plantas pueden contener cera o materia grasa que generan emulsiones en el proceso de extracción, por lo tanto es necesario desengrasar el material vegetal mediante el uso de hexano o éter de petróleo, sin embargo el proceso debe realizarse a modo de lavado para evitar extraer alcaloides en el desengrasado.²²

2.4. Composición química de la yerbamora

La composición química del aceite esencial de las hojas de la planta indica la presencia de los siguientes grupos: carbohidratos, glicosidos, alcaloides, flavonoides, saponinas y taninos. Sus compuestos mayoritarios son los ácidos grasos linoléico y palmítico, el aminoácido asparagina, el flavonoide rutina, los alcaloides solanina, solasodamina, solangustina, solanigrina, solamarina, α y β solanegrina, el esteroles triacontano, ácido cítrico, entre otros.²³

2.4.1. Alcaloides en la yerbamora

Estudios realizados por Gheewala (2013) reportan el análisis de glicoalcaloides de frutos secos de *Solanum Nigrum Linn* en la India, cuyas referencias reportan actividad biológica por la composición de dichos compuestos en frutos. El análisis se realizó por GC-MS y HPLC. Se encontró como principal constituyente el glicoalcaloide esteroide Solasonina (5,85 mg/g) y su aglicona solanidina en un porcentaje del 75,9%.²⁴

Entre los principales alcaloides se presenta la solasodina como aglicona, y como glucósidos están la solasonina y solamargina los cuales presentan una actividad potencial en el tratamiento de carcinomas de piel y uso en la industria farmacéutica como productor de esteroides tal como la diosgenina, que se obtiene de tubérculos tipo *Dioscorea spp.* también conocidos como ñame.²⁵ La aglicona solasodina presenta una estructura similar a la diosgenina, con un nitrógeno análogo, y puede ser convertida de la misma manera que la diosgenina a acetato de 16-deshidropregnenolona (figura 4), la cual se emplea en la semisíntesis de fármacos y esteroides anticonceptivos. En contraste con las especies de *Dioscorea*, las especies *solanum* son más fáciles de cultivar.²⁶

²² *Ibid.*, p. 9.

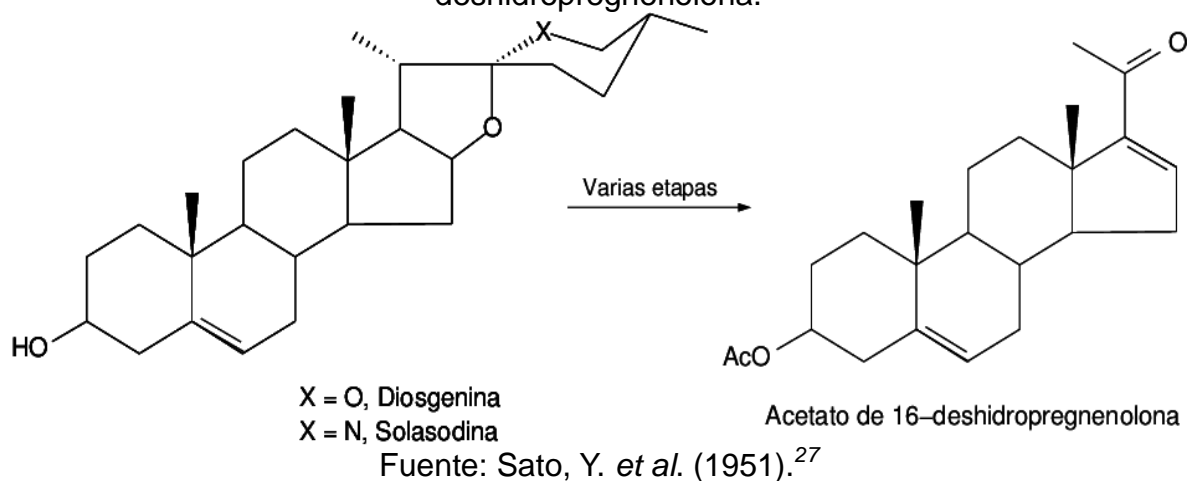
²³ Fonnegra, R. (2007). *op. cit.*, p. 272.

²⁴ Gheewala N., Saralaya M., Sonara G., Gheewala T. Phytochemical Evaluation of Total Glycoalkaloid of Dried Fruit of *Solanum Nigrum Linn*. En: Current Pharma Research (2013). vol. 3, p. 1010-1013.

²⁵ Shokrzadeh M, *op. cit.*, p. 176-179.

²⁶ Cham B., Daunter B., Evans R. Solamargine and other solasodine rhamnosyl glycosides as anticancer agents. En: Asia Pacific Journal of Pharmacology (1994). vol. 9, p. 113.

Figura 4. Estructura de la diosgenina, solasodina y el acetato de deshidropregnenolona.



Investigaciones de la familia de las solanaceas y estudios de caracterización en las especies: *Solanum esculentum*, *Solanum trilobatum*, *Solanum nigrum*, y *Solanum tuberosum* reportan la presencia de alcaloides en los extractos metanólicos. Estos extractos fueron analizados mediante HPLC y GC-MS. Este estudio permitió establecer estudios de inhibición mediante antibiogramas estableciendo que la composición química de las plantas poseen actividad antimicrobiana.²⁸

Otras propiedades terapéuticas reportadas para los alcaloides de *Solanum nigrum* extraídos de plantas medicinales en la China indican que estos compuestos presentan propiedades antitumorales en estudios *in vivo* e *in vitro*, inhibiendo el crecimiento de celular en el cáncer de cuello uterino. Se describe que los ensayos de *Solanum nigrum* L. muestran resultados significativos sobre el crecimiento de tumores.²⁹ Se describen otras propiedades en la medicina tradicional de China para esta planta y sus alcaloides, específicamente para tratamiento de cáncer gástrico y de hígado. Muestras colectadas en 9 provincias de China reportan la presencia de los alcaloides solasonina, solamargina y β -2-solamargina.³⁰

²⁷ Sato Y., Miller H., Mosettig E. Degeneration of solasodine *En*: Journal of the American Chemical Society (1951). vol. 73, p. 207.

²⁸ Akilan C., Srividhya M., Mohana P., Jeba., S; Sundara M. Comparative analysis of phytochemicals, antibiogram of selected plants in *solanaceae* family and its characterization studies. *En*: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (2014). vol. 6, p. 946-950.

²⁹ Li J., Li Q., Gao D., Han Z., Li K. Antitumor effects of total alkaloids isolated from *Solanum nigrum* in vitro and in vivo. *En*: Pharmazie (2008). vol. 63, p. 534-538.

³⁰ Bai Y., Lin C., LUO W., Wang Y., Sun C., Jia Q. Simultaneous quantification of four saponins, three alkaloids and three fatty acids in *Solanum nigrum* Linn by HPLC-ELSD. *En*: Journal of Medicinal Plants Research (2012). vol. 6, p. 3632-3639.

Otras investigaciones sobre los alcaloides presentes en las hojas, tallos y frutos de las plantas pertenecientes a la familia de las solanaceas describen las diversas propiedades medicinales que poseen este tipo de alcaloides, principalmente la solasodina. Entre ellos se encuentran usos terapéuticos por su efecto diurético, antifúngico, en el tratamiento del cáncer, cardiotónico, antiespasmódico, antiandrogénico, antipirético, y varios efectos sobre el sistema nervioso central.³¹ Se ha reportado el uso de los frutos en la medicina tradicional para el tratamiento de la disentería, diabetes y enfermedades de la piel con la aplicación del zumo de los frutos.³² Es de resaltar que *Solanum nigrum* es una planta referenciada en la farmacopea China debido a los efectos medicinales descritos anteriormente. Estos efectos se han asociado a los alcaloides extraídos y purificados entre los que se encuentran: solasonina, β -1-solasonina, solamargina y solanigrosida P. Estos glicoalcaloides tienen efectos citotóxicos en las células MGC-803, causantes del cáncer gástrico.³³

En agricultura, se han realizado estudios sobre la contaminación de semillas de chícharos y plantaciones de soya por alcaloides de los arbustos de *S. nigrum* que se encuentran como maleza cerca de los cultivos en regiones agrícolas en Canadá, determinando el glicoalcaloide α -solasonina en chícharos verdes utilizando HPLC-UV.³⁴ Así mismo se ha reconocido sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas y el uso como bio-insecticida en el control de plagas en diversos cultivos.

Para la identificación y cuantificación, se han empleado diversas metodologías de extracción y técnicas analíticas principalmente HPTLC, HPLC y GC-MS.³⁵

Estos alcaloides están presentes en las hojas, frutos, corteza y raíz de la planta. La concentración de dichos alcaloides en hojas aumenta levemente a medida que pasan las semanas de desarrollo, sin embargo la mayor cantidad de compuesto se evidencia en hojas pequeñas en relación a las maduras. En las raíces se puede observar un aumento en la concentración a medida que pasa el tiempo de desarrollo, y en frutos la concentración decrece con el tiempo. Los estudios

³¹ Patel K., Singh R., Patel D. Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of solasodine: A concise report of current scientific literature. En: Journal of Acute Disease (2013). vol. 2, p. 92-98.

³² Gogoi B., Zaman K. Phytochemical Constituents of Some Medicinal Plant Species Used in Recipe During 'Bohag Bihu' in Assam. En: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. (2013). vol. 2, p. 30-40.

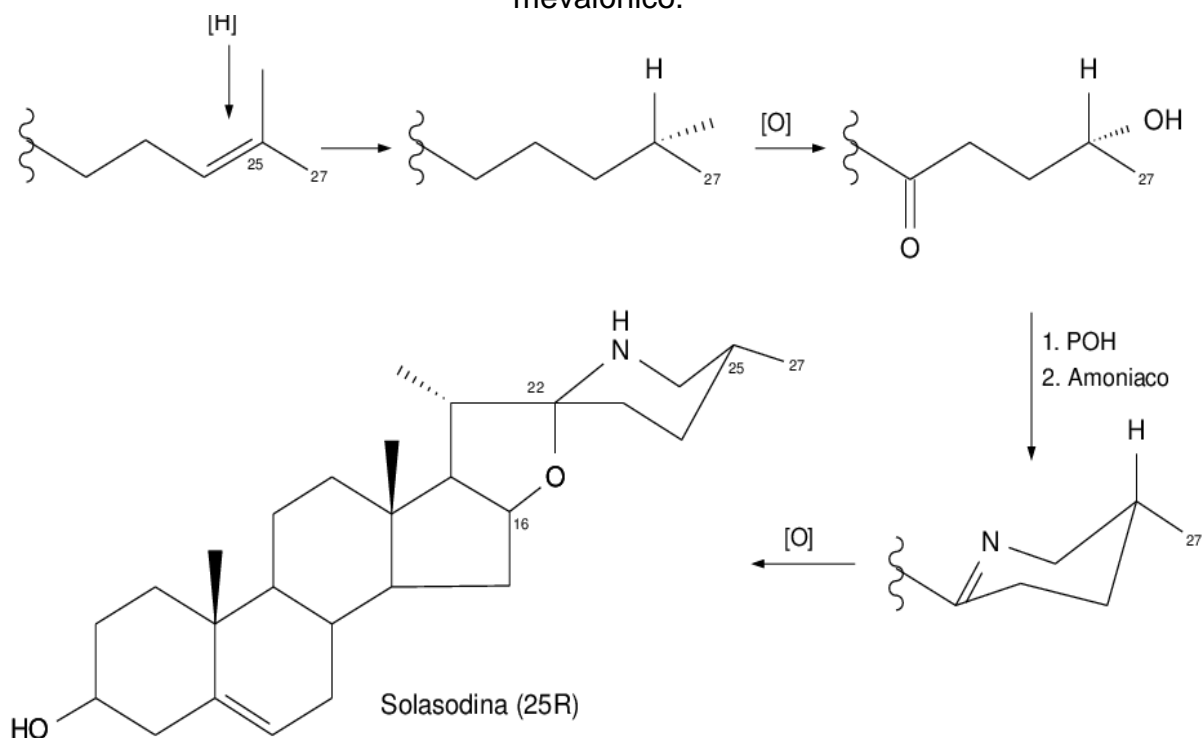
³³ Xia D., Fangshi Z., Yun Y., Min L. Purification, antitumor activity in vitro of steroidal glycoalkaloids from black nightshade (*Solanum nigrum* L). En: Food Chemistry (2013). vol. 141 p. 1181-1186.

³⁴ Cavlovic P., Mankotia M., Pantazopoulos P. Liquid Chromatographic Determination of α -Solasonine in Frozen Green Peas as an Indicator of the Presence of Nightshade Berries. En: Journal of AOAC international (2003). vol. 86, p. 759-763.

³⁵ Patel, K. (2013). *op. cit.*, p. 94.

indican que después de 28 semanas la concentración de Solasodina disminuye aproximadamente un tercio en raíces y aumenta considerablemente en el vástago. En hojas maduras aumenta hasta el valor máximo aproximadamente de 200 µg por hoja. Las hojas de *Solanum nigrum* son el órgano donde se da la síntesis mayoritaria de alcaloides.³⁶

Figura 5. Mecanismo de biosíntesis de la solasodina a partir de colesterol y ácido mevalónico.



*POH: Alcohol perílico.
Fuente: Kurt, B. *et al.* (1997).³⁷

Los alcaloides esteroideos son característicos de muchas especies de la familia solanaceae, el colesterol es un precursor de dichos alcaloides; la solasodina presenta un esqueleto esteroide intacto. En la biosíntesis de la solasodina, el C-27 del colesterol se deriva en el carbono C-2 del ácido mevalónico. Una reacción procede sin pérdida del hidrógeno 3 del C-27, la cual consiste en una aminación directa sin intervención del grupo carbonilo. Por otro lado, procede la formación de un anillo de piperidina por vía de una imina.³⁸

³⁶ Eltayeb A., Al-ansari A., Roddick J. Changes in the steroidal alkaloid solasodine during development of *solanum nigrum* and *solanum incanum*. *En: Phytochemistry* (1997). vol. 46, p. 489-494.

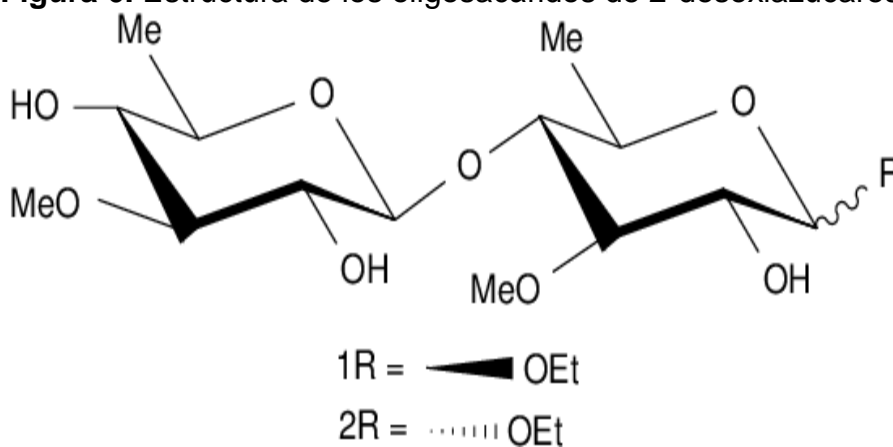
³⁷ Kurt B. (1997). *op. cit.*, p. 394.

³⁸ *Ibid.*, p. 396.

El método de extracción y purificación de alcaloides básicamente consiste en la maceración química de órganos secos pulverizados con ácido oxálico o algún otro ácido, seguido por una hidrólisis y la formación de una base insoluble en medio acuoso.³⁹

Los polisacáridos mayoritarios presentes en los órganos de *S. nigrum* presentan acción antitumoral y acción contra el carcinoma hepatocelular. Se han encontrado 2 polisacáridos mayoritarios denominados SNLWP compuesto principalmente por arabinosa, manosa, glucosa y galactosa; y SNLAP compuestos por arabinosa, manosa, xilosa, glucosa y galactosa. Los dos oligosacáridos mayoritarios de 2-desoxi azúcares presentes en las hojas de *Solanum nigrum* (figura 6), se han identificado por espectroscopía como etil-β-D-tevetopiranosil-(1-4)-β-D-oleandropiranosido (1) y etil-β-D-tevetopiranosil-(1-4)-α-D-oleandropiranosido (2) (C₁₆H₃₀O₈).⁴⁰

Figura 6. Estructura de los oligosacáridos de 2-desoxiazúcares.



Fuente: Bilbao, M. (1997).⁴¹

Las agliconas mayoritarios en la yerbamora son la solasodina y solanidina, sus estructuras se presentan en la figura 7; como glucósidos se encuentran la solasonina, α y β-solamargina y α-solanina.

La solasonina y la solamargina presentan la aglicona solasodina en su estructura, mientras que la solanina presenta la aglicona solanidina. Los carbohidratos presentes como monómeros son: ramnosa (Rham), glucosa (Glu) y galactosa

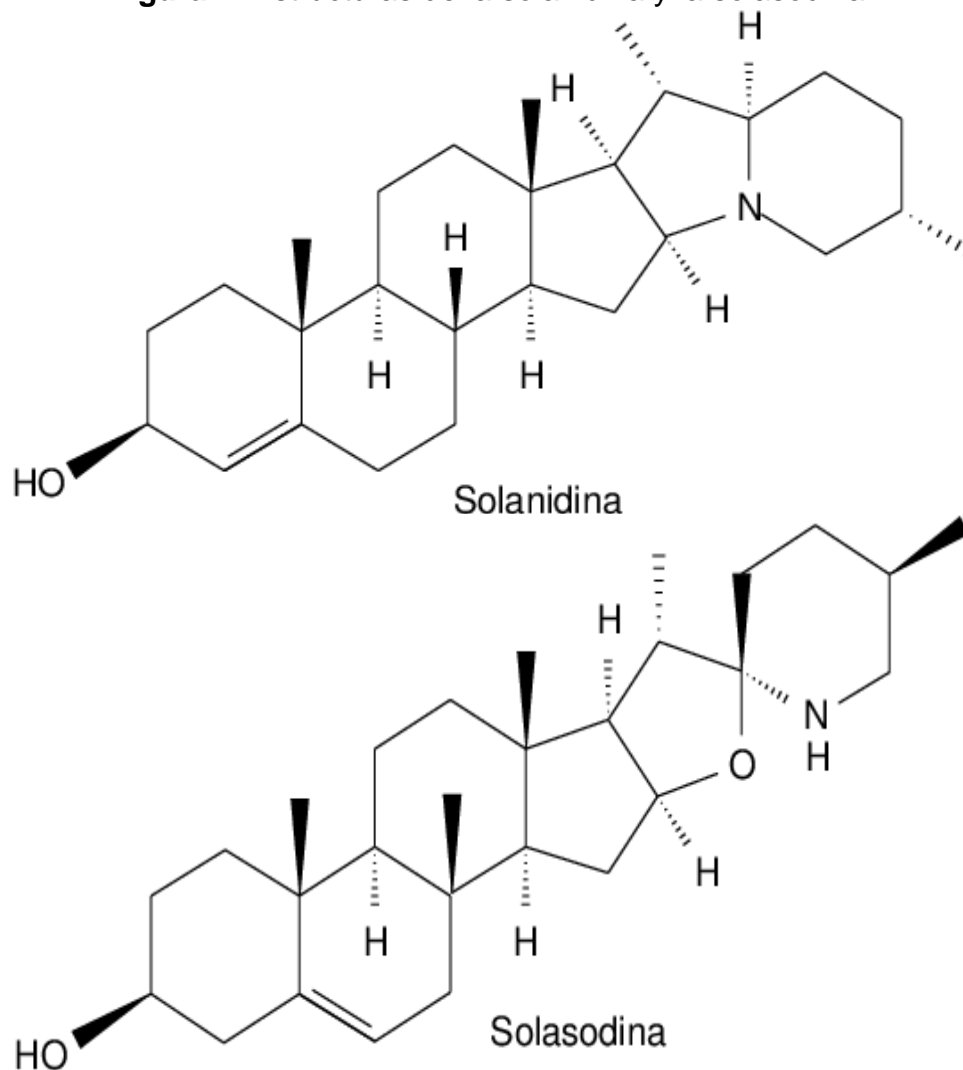
³⁹ Lancaster J., Mann J. Changes in solasodine content during the development of *Solanum laciniatum* Ait. En: New Zealand Journal of Agricultural Research (1975). vol. 18, p. 139.

⁴⁰ Chen R., Feng L., Li H., Zhang H., Yang F. Two novel oligosaccharides from *Solanum nigrum*. En: Carbohydrate Research (2009). vol. 344, p. 1775-1777.

⁴¹ Bilbao M. (1997). *op. cit.*, p. 89.

(Gal). Las unidades poliméricas son: Rham-Rham-Glu (solamargina), Rham-Gal-Glu (solanina) y Rham-Glu-Glu (solasonina). Las estructuras de estos polisacáridos se presentan en la figura 8.

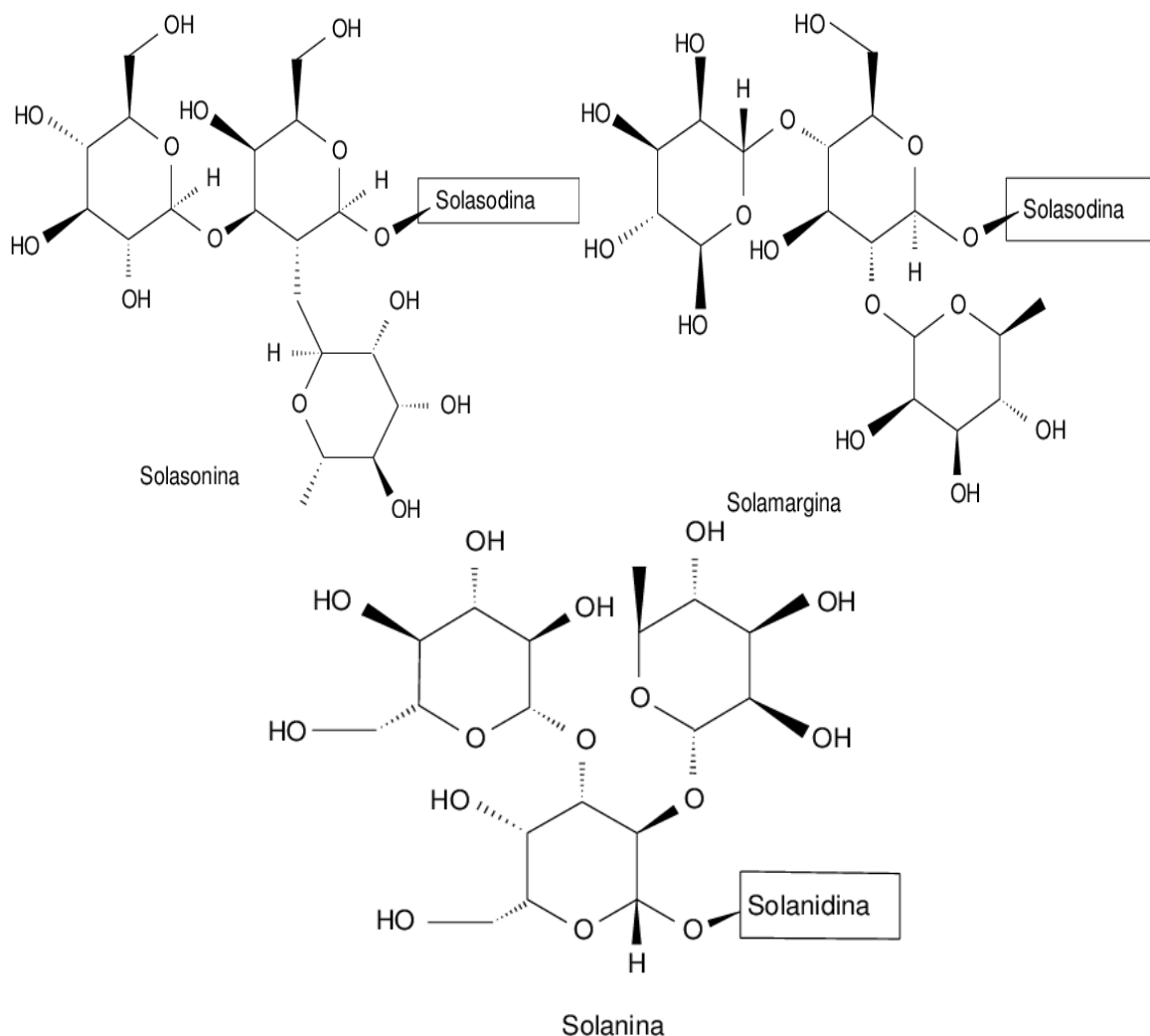
Figura 7. Estructuras de la solanidina y la solasodina.



Fuente: Wilkomirsky, T. *et al.* (2004).⁴²

⁴² Muñoz O., Montes M., Wilkomirsky T. Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. Ed Universitaria. Comité de publicaciones científicas. Universidad Santiago de Chile (2004). p. 273-274.

Figura 8. Estructuras de los carbohidratos laterales en la solasonina, solamargina y solanidina.



Fuente: Gonçalves, M. *et al.* (2006).⁴³

⁴³ Gonçalves M., Diniz M., Borba J. Modesto efeito hipolipemiante do extrato seco de berinjela (*Solanum melongena* L.) em mulheres com dislipidemias, sob controle nutricional. *En: Brazilian Journal of Pharmacognosy* (2006). vol. 16, p. 656-663.

2.5. Técnicas de extracción, purificación y análisis de alcaloides

2.5.1. Extracción en medio alcalino

Para extraer alcaloides de las hojas de una planta, se debe desengrasar el material y pulverizar para tener mayor superficie de contacto. El material desengrasado y pulverizado se mezcla con una porción igual de solución NH_4OH al 5% dejando en reposo por 4 horas y se libera la primera fracción de alcaloides con un solvente orgánico apolar o de polaridad media, esta primera fracción contendrá impurezas tal como pigmentos, esteroides, ácidos grasos, entre otros compuestos, por lo tanto se separan los alcaloides de las impurezas mediante la adición de ácido mineral diluido, formando dos capas que se pueden decantar: la solución orgánica libre de alcaloides y la solución acuosa, que contiene alcaloides. Nuevamente se vuelve a alcalinizar la solución y se extrae con un solvente no polar; la fase orgánica se separa por decantación y se obtienen los alcaloides totales, los cuales se pueden concentrar a presión reducida.⁴⁴

2.5.2. Extracción en medio ácido

Al igual que la extracción en medio alcalino, en esta extracción es necesario desengrasar las hojas y pulverizarlas previamente. Debido a que los alcaloides en su estado natural se encuentran en forma de sales, resulta útil su extracción en agua acidulada, alcohol o soluciones hidroalcohólicas aciduladas. El material vegetal se mezcla con una porción igual en volumen de etanol al 70% y se realiza una maceración química a 40°C. Después de concentrar el extracto, se alcaliniza con amoníaco 5% y se extrae con un solvente orgánico de polaridad media, en donde se podrán distinguir dos fases: la acuosa contiene los alcaloides en forma de sales solubles, la orgánica contiene impurezas tal como los esteroides o ácidos grasos. La fase acuosa es nuevamente alcalinizada con una segunda porción de amoníaco al 5% y se adiciona un solvente orgánico apolar, en la fase alcalina se encuentran las impurezas mientras que la fase orgánica presenta los alcaloides bases.⁴⁵

2.5.3. Extracción asistida por ultrasonido

La técnica de extracción de metabolitos secundarios en plantas mediante ultrasonido es un método desarrollado a lo largo de las últimas cuatro décadas.

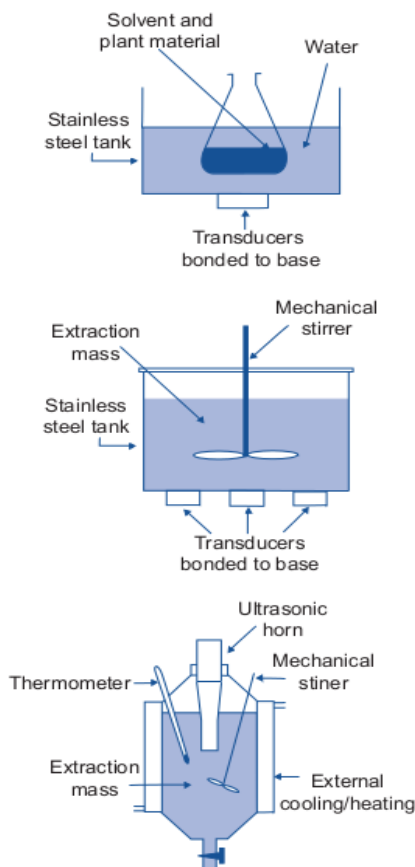
Ultrasonido hace referencia a todas las ondas sonoras que comprenden frecuencias entre 16 kHz a 10 MHz. El ultrasonido se puede clasificar en Ultrasonido de señal, cuyas frecuencias están en el rango de 100 kHz a 1 MHz, y

⁴⁴ Kurt B. (1997). *op. cit.* p. 396.

⁴⁵ *Ibid.*, p. 396.

ultrasonido de potencia, con frecuencias entre 16 a 100 kHz. Éste último es el caso de la EUA.⁴⁶ La extracción por EUA se realiza mediante un equipo sonicador, su esquema se representa en la figura 9.

Figura 9. Esquema equipos de EUA.



Fuente: Azuola, R, *et al* (2007).⁴⁷

El fundamento de la extracción por medio de EUA es el efecto hidrodinámico conocido como cavitación, en el cual las ondas sonoras que atraviesan un fluido, forman burbujas microscópicas las cuales hacen implosión a causa de la compresión, generando altas presiones y temperaturas en pequeñas áreas del fluido, esto genera ondas de choque que “bombardean” la muestra sólida fragmentándola y de esta manera reducir el tamaño de la partícula lo que aumenta el área superficial de contacto con el solvente, dispersándolo en él.⁴⁸

⁴⁶ Azuola R., Vargas P. Extracción de sustancias asistidas por ultrasonido. *En: Tecnología en marcha* (2007). vol. 20, p. 30-40.

⁴⁷ *Ibid.*, p. 35.

⁴⁸ Pino V. Extracción y preconcentración micelar. Aplicación a la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de interés medioambiental. Tesis doctoral en

El ultrasonido puede favorecer la re-hidratación de tejidos secos, abriendo los estomas de las hojas facilitando el transporte de sustancias al solvente.

La técnica de extracción se realiza por medio de un homogeneizador ultrasónico. Las ventajas de este método es su rapidez en la extracción, las cantidades bajas de disolvente empleado, sus bajos costos y la calidad de extractos. Algunas de sus desventajas son: no se puede extraer grandes cantidades de muestra (menos de 80 g de tejido vegetal), se requiere etapas de filtración y concentración de muestra post-extracción.⁴⁹

2.6. Técnicas cromatográficas

La cromatografía es un método empleado para la separación de los componentes que constituyen una muestra en donde dichos componentes se distribuyen en dos fases, una denominada fase estacionaria y la otra móvil. Según sea la fase, la cromatografía puede clasificarse por la naturaleza de la fase móvil como cromatografía de gases (GC) si la fase móvil es un gas, técnica útil para componentes volátiles; o cromatografía líquida (LC). La cromatografía líquida puede ser en capa delgada (TLC) o cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Otra diferencia entre ambas técnicas radica en los detectores ya que en HPLC se necesita un detector con mayor sensibilidad respecto a GC debido a la fase empleada; resulta más simple diferenciar una muestra cuya fase sea un gas inerte que una muestra que presente un líquido inerte de masa superior a la de la muestra. Además de esto, el tipo de columna varía según la técnica: en GC la columna es capilar, su longitud puede comprender varios metros su diámetro milímetros, mientras que en HPLC la columna es empacada y sus dimensiones son reducidas respecto al largo de la columna comparándola con la columna GC.⁵⁰

2.6.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica analítica de separación y determinación de compuestos químicos volátiles en una mezcla, este método se basa en la distribución de las moléculas en una fase estacionaria (columna) y su flujo mediante una fase móvil que es un gas portador. La fase estacionaria retiene los compuestos afines a ella según su polaridad, una de las columnas más empleadas en la separación de compuestos de alcaloides es la columna DB-5 compuestas de 5% difenil 95% dimetilsiloxano de dimensiones: 30 m de longitud y diámetros

química analítica. Universidad de la Laguna. Tenerife, España (2002). p. 32-35.

⁴⁹ Djilani A., Legseir B., Soulimani R., Dicko A. New extraction technique for alkaloids. En: Journal of the Brazilian Chemical Society (2006). vol. 17, p. 29.

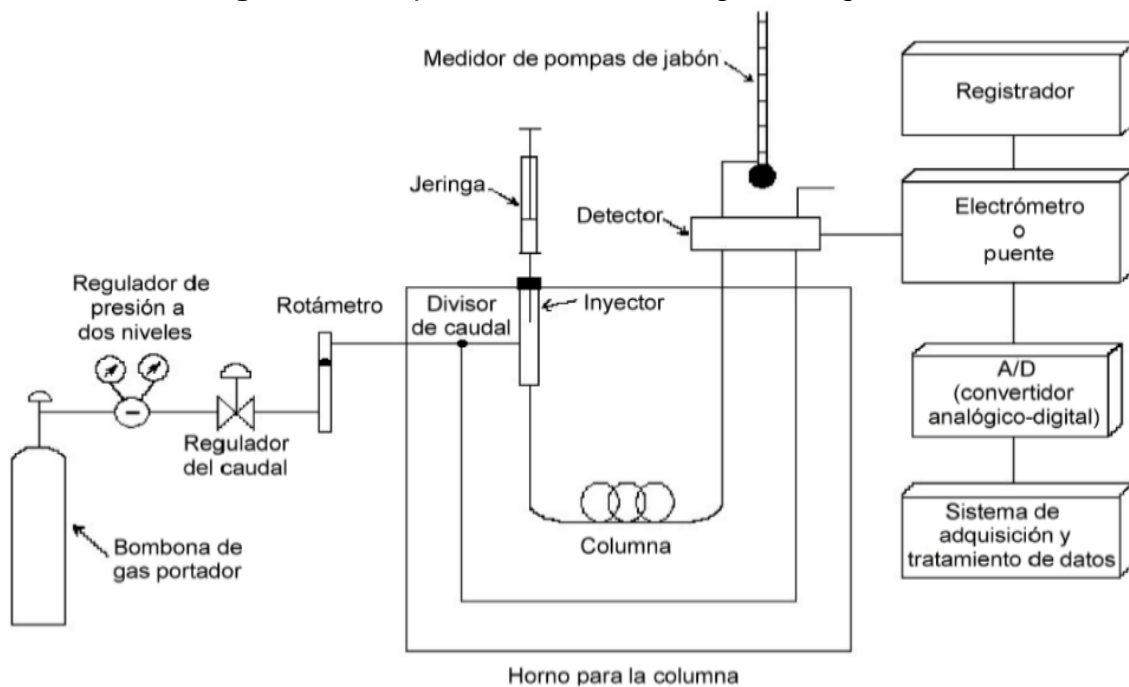
⁵⁰ Quattrocchi O., Andrizzi S., Laba R. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Buenos Aires (1992). p. 14-48.

internos entre 0,25 a 0,32 mm, el espesor de fase es de aprox. 0,25 μm .⁵¹

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es una técnica muy empleada para determinar compuestos orgánicos a nivel de trazas ya que es capaz de obtener registros tridimensionales, esto quiere decir que para cada tiempo de retención (tiempo entre la inyección de la muestra en la columna y el registro de un pico de analito al detector) se obtiene un espectro de masas de las moléculas que han emergido de la fase estacionaria. Esto es importante para identificar y cuantificar los analitos que componen la mezcla de componentes volátiles y semivolátiles del aceite esencial de una especie vegetal.⁵²

La figura 10 indica el esquema de un cromatógrafo de gases.

Figura 10. Esquema de un cromatógrafo de gases.



Fuente: Skoog, D. *et al.* (2007).⁵³

La espectrometría de masas se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, dichos iones son separados de acuerdo a

⁵¹ Zhao R., Yuan J., Li H., Wang X., Jian T., Lin J. Nonequilibrium hollow-fiber liquid-phase microextraction with in situ derivatization for the measurement of triclosan in aqueous samples by gas chromatography-mass spectrometry. *En: Journal of Analytical and bioanalytical chemistry* (2007). vol. 387, p. 1911.

⁵² Skoog D., Holler F., Nieman T. Principios de análisis instrumental, quinta edición, Ed. McGraw-Hill (2007), p 788-796.

⁵³ Skoog D. *et al.* (2007). *op. cit.* p. 790.

su relación masa carga (m/z). La introducción de la muestra puede ser directa o indirecta, sin embargo resulta mejor para un análisis una introducción a partir de un cromatógrafo; posteriormente la muestra pasa por la fuente de iones la cual puede ser ionización electrónica (EI) o ionización química. A la salida de la fuente de iones se encuentra el analizador de masas, encargado de separar los diferentes iones producidos con el fin de detectarlos de manera individual. Algunos de los analizadores más empleados son el analizador de campo magnético, analizador cuadrupolar y la trampa de iones. Por último, los iones proceden al detector para poder relacionar la masa de dichos iones con la intensidad de la corriente.⁵⁴

Además de permitir la identificación de los compuestos, la técnica de GC-MS permite cuantificar. Una de las formas de cuantificar analitos se basa en el uso del método del estándar interno; en el cual se añade a la muestra una cantidad conocida y constante de un estándar el cual es similar al analito pero no idéntico (se puede tratar de iguales grupos funcionales sin ser el mismo compuesto). La señal del analito se compara con la señal del estándar interno mediante la siguiente ecuación:⁵⁵

$$\frac{A_x}{C_x} = F * \frac{A_s}{C_s}$$

Ecuación 1

En donde A_x es el área del pico x y C_x su concentración; A_s es el área del estándar interno y C_s su concentración. F es el factor de respuesta.

El estándar interno debe cumplir con las siguientes características:

- Presentar alta pureza.
- Inerte frente a los componentes de la muestra.
- No debe estar presente en la muestra a analizar.
- Soluble en el solvente de la muestra.
- No debe eluir junto con algún componente de la muestra.

2.6.2 Cromatografía líquida de alta resolución HPLC

La cromatografía líquida de alta eficiencia presenta varias modalidades de separación según la naturaleza del analito, algunas de las modalidades más empleadas son la cromatografía líquido-sólido (LSC) o de adsorción (fase estacionaria polar), cromatografía de intercambio iónico (IEC) en donde la fase estacionaria está constituida por un polímero o sílica gel, cromatografía de exclusión de partículas (SEC) la cual funciona como tamiz, etc.

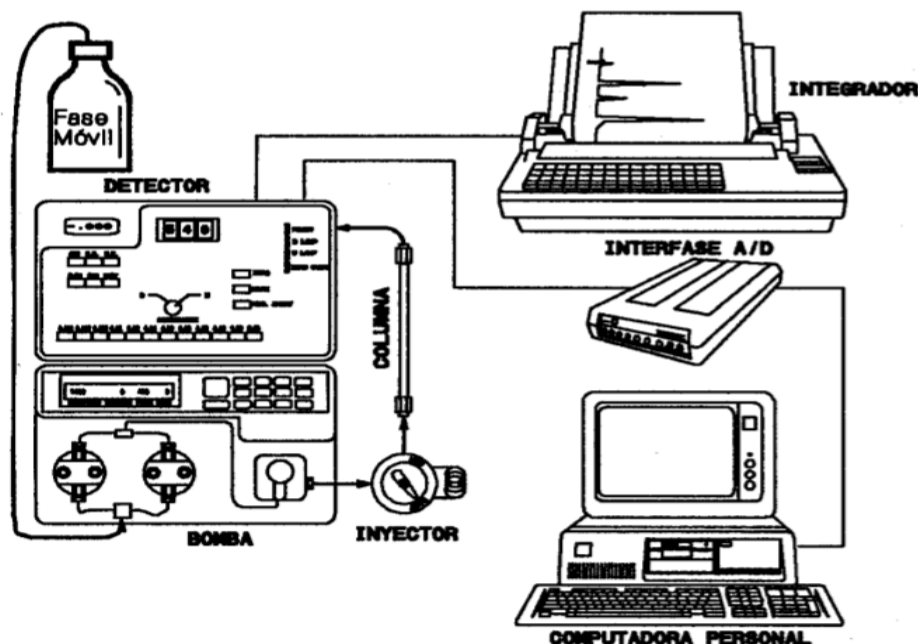
⁵⁴ *Ibid.* p. 792.

⁵⁵ Larsson C. The use of an "internal standard" for control of the recovery in microdialysis. En: Pharmacology Letters (1991). vol. 49, p. 73-78.

Un cromatógrafo líquido (figura 11) se constituye por un reservorio, el cual alimenta al sistema con la fase móvil; un inyector de la muestra, una bomba que permite el paso de la fase móvil a través de la columna, un detector o sistema de monitoreo, y un procesador de datos o integrador que permite registrar e interpretar datos.⁵⁶

Una condición de análisis óptima para alcaloides es empleando una columna RP-18, 250-4,5 μm , como fase móvil se puede emplear la mezcla ácido ortofosforico, metanol y acetonitrilo a diferentes gradientes; flujo de 1mL.min⁻¹, volumen de inyección de 80 μL , longitud de onda: 254 nm.⁵⁷

Figura 11. Esquema de un cromatógrafo HPLC



Fuente: Quattrocchi, O. *et al.* (1992).⁵⁸

2.6.3 Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas LC-MS/MS

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) es una técnica muy útil ya que se aplica a una amplia gama de compuestos químicos, no requiere derivatización pre o post-columna de la muestra lo cual es útil tanto para

⁵⁶ Zhao R. *et al.* (2007). op, cit. p. 1911.

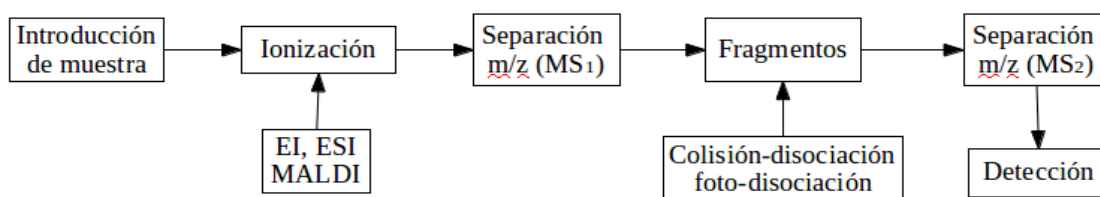
⁵⁷ Fang S., Shengyu L., Dajun H., Gang C. Effects of glycoalkaloids from *Solanum* plants on cucumber root growth. *En: Phytochemistry* (2010). vol. 71, p. 1534-1538.

⁵⁸ Quattrocchi O. *et al.* (1992) op, cit. p. 30.

compuestos volátiles como de compuestos no volátiles y termolábiles, realiza un análisis tridimensional ya que se obtienen registros de tiempo de retención, espectro UV-Vis y fragmentaciones de los componentes de la muestra.

Esta técnica suele emplear detectores espectrométricos multi-masas, es decir LC acoplada a espectros de masas de tipo Tándem (LC-MS/MS ó LC-MS²), en donde los iones son formados en la fuente de iones (que puede ser EI, ESI o MALDI) y separados de acuerdo a su relación masa-carga (m/z) en el primer analizador de masas (MS₁), estos iones formados se denominan iones precursores. Posteriormente estos iones se seleccionan y se generan nuevos iones (iones productos), estos iones se forman por disociación inducida por colisión, foto-disociación o algún otro proceso sobre los iones precursores. Los iones productos son seleccionados, separados y detectados en el segundo analizador de masas (MS₂) para posteriormente dirigirse al detector. Este proceso se muestra en la figura 12.⁵⁹

Figura 12. Diagrama de la espectrometría de masas Tándem.



Fuente: Vogeser, M. *et al.* (2007).⁶⁰

Los analizadores de masas tienen como función separar las especies formadas respecto a su relación masa-carga. Existen muchos tipos de analizadores de masas, entre los más empleados están:

- Cuadrupolos y analizadores de trampas de iones: Los iones son filtrados empleando potenciales electrostáticos los cuales seleccionan los iones de acuerdo a su relación m/z .
- Analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF): Los iones son separados empleando su diferencia de tiempos de vuelo a través de una trayectoria extendida.
- Analizadores de masas de sector magnético: Usan campos magnéticos con el fin de seleccionar los iones dirigiendo el haz de interés hacia el detector.⁶¹

⁵⁹ Kang J. Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples, Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles. In-Tech open science, Dr. Jeevan Prasain (2012). p. 441-492.

⁶⁰ Vogeser M., Parhofer K. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)-technique and applications in endocrinology. *En*: German society of endocrinology (2007). vol. 9, p. 559-570.

⁶¹ Kang J. *op. cit.* p. 450.

2.7. Diseño experimental

El diseño experimental se define como una serie de pruebas que caractericen los factores X_i (variables independientes de entrada controlables) que tengan mayor influencia en un ensayo, de esta manera se evalúan las variaciones en los factores que generen una respuesta cuantitativa. Este proceso se realiza con el fin de minimizar el efecto de las variables no controlables Z_i o covariables y así minimizar la variabilidad de las respuestas.⁶²

Un diseño experimental presenta dos fases principales:

- Caracterización de un proceso*: en donde se determinan los rangos de las variables controlables que más influyan en los factores de respuesta y así minimizar el efecto de las covariables.
- Optimización de un proceso*: en donde se determinan los niveles de los factores caracterizados que dan una respuesta óptima.

2.7.1. Tipos de diseño experimental

Para elegir el tipo de diseño experimental hay que tener en cuenta varios factores entre los que se encuentran el objetivo del experimento, el número de factores a controlar, los niveles que se someterán en cada factor, los efectos esperados, entre otros. Es por esa razón que un diseño experimental se debe clasificar según convenga.⁶³

Generalmente los experimentos se clasifican en dos tipos: el *experimento absoluto* y el *experimento comparativo*. El experimento absoluto centra su interés en la estimación y las propiedades físicas de la población estudiada, la selección de tratamientos se realiza mediante procesos aleatorios. En el experimento comparativo los tratamientos se comparan por sus efectos medios sobre un factor de respuesta con el fin de determinar qué tratamiento es el que más se adecúa a un factor de respuesta óptimo. Sin embargo una forma de clasificar específicamente un diseño es en función del objetivo de experimento, la estrategia de comparación y la cantidad de variables independientes, de esta manera se tienen los siguientes tipos de diseño:⁶⁴

- Comparativos (diseños al azar, diseños de bloques, etc.)
- Factoriales (2^n , 3^n , etc.)

⁶² Bartlett M. Properties of Sufficiency and Statistical Tests. En: Proceedings of the Royal Society of London (1937). vol. 160, p. 268-282.

⁶³ Anscombe F. The Validity of Comparative Experiments. En: Journal Royal of the Statistical Society (1947). vol. 61, p. 181-211.

⁶⁴ Box G., Wilson K. On the Experimental Attainment of the Optimum Conditions. En: Journal of the Royal statistical society (1951). Vol. 13, p. 30-45.

- Diseños de mezclas (diseño de redes, axial, etc.)
- Robustos (Diseños ortogonales)

2.7.2. Metodología de superficies de respuesta

La metodología de superficies de respuesta (MRS) es un conjunto de técnicas de diseño experimental y optimización de procesos en donde se considera una variable cuantitativa de respuesta (y) que depende de una serie de factores x_i ($i=1, \dots, k$) y parámetros β_m ($m=1, \dots, l$) relacionados por: $y=n(x_1, \dots, x_k; \beta_1, \dots, \beta_l)$

La MSR es una estrategia analítica que permite determinar las condiciones óptimas de un proceso implicando tres aspectos: *diseño*, *modelo* y *técnica de optimización*. Los dos primeros aspectos tienen relación entre sí dependiendo del comportamiento entre las variables y las respuestas del experimento, mientras que la técnica de optimización arroja información sobre el punto óptimo en el que interactúan las variables de respuesta.⁶⁵

La MSR se fundamenta en encontrar los niveles óptimos de un factor para una determinada respuesta centrando la atención en los niveles que den una respuesta de interés óptimo, esto implica mejorar significativamente el resultado de un experimento respecto al tiempo, condiciones, eficiencia, entre otros factores. La interacción de muchas variables afectan el resultado de un experimento, estas variables afectan en diferente proporción, por lo tanto para elaborar una buena MSR resulta necesario seleccionar los factores que afecten cierta característica de manera significativa; por esta razón es necesario realizar un análisis de varianza ANOVA.

Dicha interacción entre variables es de forma polinomial, para ello se efectúan metodologías de tipo factorial, uno de ellos es la metodología de Superficie de respuesta factorial 2^k , donde k son los factores que afectan una característica, la base 2 indica los niveles los cuales pueden ser bajos o altos, por lo tanto el experimento cuenta con 2^k tratamientos. La ecuación de primer orden está dada por:⁶⁶

$$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{1,2} x_1 x_2 + \xi \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde:

μ_y = promedio de la variable de respuesta.

β_0 = valor medio de la respuesta en ausencia de los factores x_1 y x_2 .

⁶⁵ Derringer G., Suich R. Simultaneous optimization of several responses. En: Journal of Quality Technology (1980). vol. 12, p. 215.

⁶⁶ Khuri A., Cornell J. Response Surfaces. Dekker, New York (1987). p. 305.

β_1 = efecto lineal del factor 1 sobre la respuesta en promedio.
 β_2 = efecto lineal del factor 2 sobre la respuesta en promedio.
 $\beta_{1,2}$ = relación de interacción entre x_1 y x_2 sobre la respuesta en promedio.
 ξ = efectos no explicados por el modelo (error).

2.8 Antecedentes

El grupo de investigaciones botánicas de la Universidad de Nariño en conjunto a la Universidad Nacional de Colombia realizaron en 2005 un estudio etnobotánico en las poblaciones de Casabuy, Hato viejo y Sánchez en el municipio de Chachagüí, Nariño, encontrando en la familia *solanaceae* 9 especies, de las cuales aprox. 55,4% de ellas se encuentran en matorrales y zonas abiertas. La especie *Solanum nigrum* L. presenta el porcentaje más elevado del índice de versatilidad, y del uso cultural contra las enfermedades asociadas al aparato respiratorio, sistema nervioso y enfermedades cutáneas son tratadas con la mayor cantidad de especies.⁶⁷

Entre las especies de la familia *solanaceae* se encontró que la Yerbamora (*Solanum nigrum*) presenta siete registros de uso y actualmente está aprobada en el Vademécum Colombiano de plantas Medicinales como coadyuvante en el tratamiento de inflamaciones cutáneas.^{68,69}

El interés por esta planta nace por los conocimientos ancestrales y etnobotánicos, sin embargo el enfoque científico se hizo conocer en la última década gracias a investigaciones sobre la actividad anti-cancerígena de los glicoalcaloides esteroidales como agentes en la quimioterapia. El género *Solanum* abarca cerca de 1400 especies de plantas de las cuales *Solanum nigrum* L. es una de las más importantes a nivel medicinal debido a la presencia del glicoalcaloide esteroide solasodina, el cual se considera una alternativa potencial en la síntesis de diosgenina la cual es precursora de muchos fármacos esteroidales, tales como anticonceptivos, hormonas, reductores de colesterol, entre otros. Muchas investigaciones reportan que los glicoalcaloides presentes en esta planta presentan actividad como antiacelerador cardíaco, inhiben la acetilcolinesterasa, la cual es una enzima clave en la transmisión del impulso nervioso, por lo tanto puede tener una aplicación potencial en la industria de fármacos antidepresivos y sedantes.⁷⁰

⁶⁷ Bernal, H., García M., Quevedo S. Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia: Estrategia nacional para la conservación de plantas. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial e Instituto de Investigación de recursos Biológicos Alexander von Humboldt (2011). p. 141-149.

⁶⁸ Vademécum colombiano de plantas Medicinales. Ministerio de Protección Social (2008). p. 304.

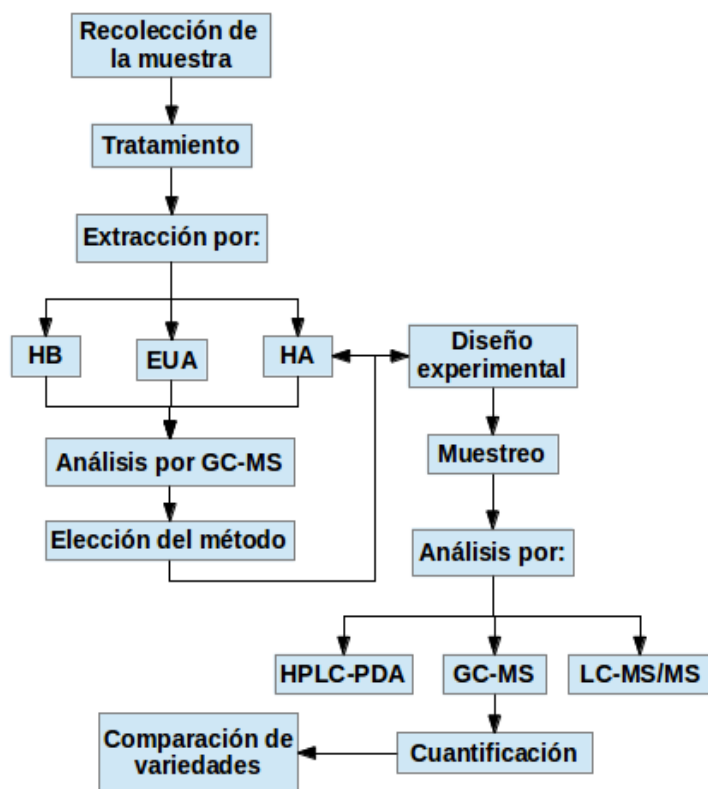
⁶⁹ Moncayo N; Zambrano J. Plantas medicinales utilizadas en las zonas de manejo de la comunidad indígena Monilla Amena (Amazonas). En: Colombia, Universidad y Salud. Ed. Universidad de Nariño (2006). p. 15-33.

⁷⁰ Šutkovic J., Ler D., Gawwad M. In vitro production of solasodine alkaloid in *solanum nigrum* under salinity stress. En: Journal of Phytology (2011). vol. 3, p. 43-49.

3. METODOLOGÍA

El esquema general de la metodología se muestra en la figura 13.

Figura 13. Diagrama general de la metodología.



Fuente: Esta investigación.

3.1. Recolección de muestras

Se realizó un muestreo aleatorizado de hojas de yerbamora (*Solanum nigrum* L) procedentes de la vereda San Felipe, en el corregimiento de Obonuco en las coordenadas N 1° 11' 47,8" E 77° 19' 28,8" a 3200 m.s.n.m. aprox. y en la vereda El Convento, municipio de Chachagüí en las coordenadas N 1° 22' 25,0" E 77° 14' 33,5" a 1900 m.s.n.m. aprox. Las muestras fueron recolectadas en estado de madurez del fruto manifestado en la coloración violeta oscuro de los frutos, como lo cita Ogg A. *et al.* (1981).⁷¹

⁷¹ Ogg A., Rogers B., Schilling E. Characterization of Black Nightshade (*solanum nigrum*) and related species in the United States. *En: Weed Science*. Vol. 29, p. 27-32.

3.1.1. Clasificación taxonómica de las muestras

Un ejemplar significativo de yerbamora de cada región fue entregado al laboratorio de taxonomía vegetal del herbario PSO de la Universidad de Nariño para su clasificación taxonómica, cuyo certificado se observa en los Anexos A y B.

3.2. Material general de laboratorio y reactivos químicos

El tratamiento de las muestras, la extracción de alcaloides y el análisis instrumental por GC-MS y HPLC fueron desarrollados en el laboratorio de Cromatografía de la sección de laboratorios de la Universidad de Nariño.

3.2.1. Material general de laboratorio

- Micropipetas Böeco de volumen ajustable (100 – 1000 µL).
- Balanza analítica Pioneer OHAUS PA214.
- Agitador magnético Agimatic-N (P-Selecta).
- Plancha de calentamiento Gerhardt Bonn EV16.
- Minimolino Janke Kunkel modelo IKA A-10.
- Baño ultrasónico Fisher FS20H.
- Rotaevaporador Eyela 1100.
- Bloque térmico de temperatura ajustable Eyela MG-2200.

3.2.2. Reactivos químicos

Los reactivos químicos empleados en todos los procesos fueron reactivos para extracción y análisis: Cloroformo grado HPLC (Honeywell) - Etanol absoluto (Sigma Aldrich) - Ácido sulfúrico (Merck-millipore) - Amoníaco (Honeywell) - Dodecil sulfato de sodio (Merck-millipore) - Cloruro de sodio (Merck) - n-Hexano (Sigma Aldrich) - Cafeína (Alfa-Aesar) MSTFA (Sigma Aldrich).

3.3. Tratamiento de las muestras

Se seleccionaron las hojas con las mejores características físicas, que cumplieran un tamaño adecuado y su coloración sea verdosa; se descartaron las hojas amarillentas o marrones, agujereadas o con marcas. El material vegetal seleccionado se lavó con agua destilada para remover tierra e impurezas y se secó al ambiente por un día, posteriormente se almacenó durante una semana sobre capas de papel periódico con el fin de deshidratar las hojas y secarlas para su posterior molienda. El proceso de secado se presenta en la figura 14.

Figura 14. Secado de hojas de *Solanum nigrum* en papel periódico.



Fuente: Esta investigación.

Las hojas secas fueron pulverizadas en el minimolino Janke Kunkel, como se observa en la figura 15; posteriormente se almacenaron en bolsas de papel para su posterior tratamiento, rotulando las bolsas con la información de procedencia de la muestra y el tipo de extracción al cual se someterían.

Figura 15. Molienda de hojas en el minimolino.



Fuente: Esta investigación.

3.3.1. Desengrase del material vegetal

50 g de material vegetal molido y seco fue sometido a desengrase empleando 150 mL de n-hexano, realizando una maceración química a 25°C por 2 horas empleando una plancha de calentamiento con agitación magnética. Posteriormente se filtró el contenido del desengrase por filtración a gravedad usando papel filtro franja azul. Se realizaron pruebas cualitativas de Dragendorff y Mayer al filtrado con el fin de asegurar la ausencia de alcaloides en dicha fracción. La fracción sólida del filtrado que contenía el material vegetal desengrasado fue secada a temperatura ambiente y almacenada para los posteriores análisis. Este proceso se realizó para las dos regiones de muestreo por separado.

3.4. Evaluación de los métodos de extracción

Para la evaluación de los procesos de extracción de alcaloides de hojas de yerbamora realizaron tres métodos (extracción ácida, extracción alcalina y extracción asistida por ultrasonido), los cuales son los más usados para el análisis de alcaloides en especies de *Solanum nigrum*.⁷² Las extracciones se realizaron por triplicado para cada método empleando hojas de la variedad recolectada en Obonuco. Los datos obtenidos en cada ensayo se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza ANOVA, usando el programa *Statgraphics centurion XV*. La tabla 2 presenta la evaluación de los métodos de extracción.

Tabla 2. Evaluación de los métodos de extracción para el análisis de alcaloides en yerbamora.

Método de extracción	Ensayo 1	VR	Ensayo 2	VR	Ensayo 3	VR
HA	E ₁ M ₁	VA ₁	E ₂ M ₁	VA ₂	E ₃ M ₁	VA ₃
HB	E ₁ M ₂	VB ₁	E ₂ M ₂	VB ₂	E ₃ M ₂	VB ₃
EUA	E ₁ M ₃	VC ₁	E ₂ M ₃	VC ₂	E ₃ M ₃	VC ₃

VR= Variable de respuesta (dependiente) mg/g de alcaloides.

E_nM_n= Ensayo número n, muestra n.

VN_n= Valor n del ensayo n.

Fuente: Esta investigación.

De los datos obtenidos en la evaluación del método de extracción, se escogió el método que reportó mayor número de picos cromatográficos correspondientes a alcaloides y su concentración expresada en mg/g de muestra, de acuerdo a la

⁷² Wang D., Wang S., Du Q., Wang N., Liu S., Wang X., Jiang J. Optimization of Extraction and Enrichment of Steroidal Alkaloids from Bulbs of Cultivated *Fritillaria cirrhos*. *En: BioMedical Research International* (2014). vol. 1, p. 15.

cuantificación e identificación en las hojas de yerbamora por GC-MS. De esta manera se cumple con las figuras de mérito de identidad, selectividad y eficiencia en los análisis.

3.5. Extracción de alcaloides de yerbamora

De acuerdo en lo planteado en el ítem 3.4. (Evaluación de los métodos de extracción), se procedió a realizar las extracciones de alcaloides de yerbamora recolectada en Obonuco y Chachagüí de acuerdo a la metodología descrita a continuación.

3.5.1. Extracción ácida de alcaloides

Se pesaron 5 ($\pm 0,2$) g del material vegetal pulverizado y desengrasado en una balanza analítica, los cuales se transfirieron a un erlenmeyer de 250 mL de boca esmerilada y se adicionaron 60 mL de ácido sulfúrico 2M en etanol al 70%. El sistema se conectó a un condensador y se sometió a reflujo por 4 horas a 78°C, temperatura controlada por termómetro. La figura 16 muestra el sistema de reflujo.

Figura 16. Sistema de reflujo en medio ácido.



Fuente: Esta investigación.

Posteriormente se filtró el contenido por gravedad empleando papel filtro franja azul, recibiendo el filtrado en un embudo de decantación. Se adicionaron 15 mL de amoníaco al 25% hasta pH 9 (comprobando el pH con papel tornasol), enseguida se adicionaron 10 mL de cloroformo grado HPLC y 5 mL de NaCl al 10% con el fin de romper las emulsiones formadas; se agitó vigorosamente y se dejó en reposo hasta la separación completa de fases, las cuales se separaron por decantación, conservando la fase orgánica; se realizaron 2 extracciones sucesivas con 10 mL de cloroformo.

Se juntaron las fases orgánicas y se procedió a acidular con 30 mL de ácido sulfúrico 2 M hasta pH 4 con el fin de separar los alcaloides en su forma protonada. Se adicionaron 5 mL de NaCl al 10 %, y se agitó vigorosamente, se dejó en reposo para su posterior separación conservando la fase acuosa; la cual se neutralizó con NaOH 2 M y se llevó a pH 9. Se procedió a realizar dos extracciones sucesivas de 10 mL de cloroformo, conservando la fase orgánica. Para comprobar que la extracción de alcaloides sea completa y no queden remanentes en los residuos, se realizó una prueba cualitativa con los reactivos Dragendorff y Mayer, de esta manera se determinó que las extracciones fueron suficientes.

Finalmente se concentró el extracto a presión reducida empleando un rotaevaporador (figura 17) y reconstituyéndolo en 1,0 mL de diclorometano grado HPLC para el análisis por GC-MS como se describe en la sección 3.7.

Figura 17. Rotaevaporación de un extracto.



Fuente: Esta investigación.

La extracción ácida fue realizada por triplicado para cada región de recolección con la misma cantidad de material vegetal sin desengrasar, con el fin de determinar si hay pérdida de analitos en este procedimiento y contrastar los resultados obtenidos. Algunos autores como Eltayeb E. (1997)⁷³ o Ding X (2013)⁷⁴, no realizan el proceso de desengrase en muestras de *Solanum nigrum*, mientras que Al-Ashaal H. (2010)⁷⁵ no reporta desengrase para muestras de *Solanum tuberosum* L.

3.5.2. Extracción básica de alcaloides

Se pesaron 5 (\pm 0,2) g de material vegetal tratado y desengrasado en un erlenmeyer de 125 mL sobre los cuales se añadieron 60 mL de amoniaco al 25%. Se sometió el sistema a maceración química en una plancha de agitación magnética como en la figura 18, a 25°C por 4 horas en campana de extracción. Posteriormente la muestra fue filtrada por gravedad recibiendo el filtrado en un embudo de decantación, el cual contenía 10 mL de cloroformo grado HPLC.

Figura 18. Agitación magnética en la extracción básica.



Fuente: Esta investigación.

⁷³ Eltayeb A. *et al.* (1997). *op. cit.*, p. 490.

⁷⁴ Ding X., Zhu F., Yang Y., Li M. Purification, antitumor activity in vitro of steroidal glycoalkaloids from black nightshade (*solanum nigrum* L.). *En: Food chemistry* (2013). vol. 141, p. 1181-1186.

⁷⁵ Al-Ashaal H. Regeneration, in vitro glycoalkaloids production and evaluation of bioactivity of callus methanolic extract of *Solanum tuberosum* L. *En: Fitoterapia* (2010). vol. 81, p. 600-606.

Se realizaron 3 extracciones con igual volumen de cloroformo, conservando la fase orgánica, la cual una vez separada se aciduló con H_2SO_4 2 N hasta pH 4 y se adicionaron 5 mL de NaCl al 10%, agitando vigorosamente el embudo.

Se separó la fase acuosa la cual fue basificada con amoniaco al 10% hasta pH 8 (confirmando el pH mediante papel tornasol). Se procedió a realizar dos extracciones sucesivas con 10 mL de cloroformo grado HPLC.

Se concentró el extracto a presión reducida y se reconstituyó el extracto en 1,0 mL de diclorometano grado HPLC para el análisis por GC-MS como se describe en la sección 3,7.

Se realizó el mismo proceso por triplicado para cada muestras sin desengrasar.

3.5.3 Extracción asistida por ultrasonido

Se depositaron 5 ($\pm 0,2$) g del material vegetal desengrasado en un erlenmeyer de 125 mL sobre el cual se adicionaron 80 mL de solución dispersante SDS 0,1% y se sonificó el sistema por 4 horas a 25°C en un baño ultrasónico como lo indica la figura 19.

Figura 19. Baño ultrasónico Fisher FS20.



Fuente: Esta investigación.

Se filtró la mezcla por gravedad empleando papel filtro franja azul y recolectando el filtrado en un embudo de decantación.

La solución acuosa fue basificada con amoníaco al 10% hasta pH 8 y se extrajo con 3 porciones de 10 mL de cloroformo grado HPLC, recolectando la fase orgánica, la cual fue acidificada a pH 4 con H_2SO_4 2 M comprobando el pH con papel tornasol y se aumentó la fuerza iónica con NaCl al 10% para mejorar la separación de fases.

Se agitó vigorosamente el embudo y se separó la fase acuosa la cual fue basificada nuevamente con amoníaco al 10% hasta pH 8. Los alcaloides se extrajeron con 3 porciones de 10 mL de cloroformo grado HPLC.

Se concentró el extracto a presión reducida y se reconstituyó el extracto en 1,0 mL de diclorometano grado HPLC para el análisis por GC-MS como se describe en la sección 3.7.

El mismo procedimiento se realizó por triplicado para material vegetal sometido al desengrasado y sin desengrasar.

3.6. Diseño experimental

A través de un diseño experimental se optimizaron las condiciones de los factores que intervienen en el proceso de extracción para el método que reportó mayor rendimiento.

Para este propósito, se realizó un diseño de experimentos tipo superficie de respuestas 2^3 (dos factores: concentración y tiempo - tres niveles: alto, medio y bajo). Este tipo de diseños ha sido utilizado para la optimización de los factores que influyen en los procesos de extracción de componentes bioactivos en productos naturales.⁷⁶

Los factores experimentales a evaluar para el método son: concentración de ácido sulfúrico y tiempo de extracción. La variable de respuesta es la concentración de alcaloides expresada en mg/g de material vegetal.

Para el tratamiento y optimización del diseño se empleó el paquete estadístico Statgraphic centurion XV.

⁷⁶ Guo L., Cho Y., Kang S., Lee S., Baek Y., Kim Y. Orthogonal array design for optimizing extraction efficiency of active constituents from Jakyak-Gamcho Decoction, the complex formula of herbal medicines, *Paeoniae Radix* and *Glycyrrhizae Radix*. En: Journal of Ethnopharmacology (2007). vol. 113, p. 306-311.

La tabla 3 presenta los factores y niveles del diseño experimental.

Tabla 3. Diseño experimental de superficie de respuesta: concentración de ácido y tiempo de extracción.

Niveles	Factores	
	Concentración de ácido (M)	Tiempo de extracción (hrs)
1	0,5	4
2	1,0	6
3	2,0	8

Nivel bajo: 1; nivel medio: 2; nivel alto: 3.

Fuente: Esta investigación.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción de los alcaloides de la yerbamora, se analizó un nuevo lote de muestras extraídas de acuerdo a los resultados de la optimización del diseño de experimentos con el fin de identificar, cuantificar y comparar las variedades de *Solanum nigrum* en las dos zonas de recolección (ver figura 13).

3.7. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Para el análisis de las muestras por GC-MS se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas Shimadzu GC-MS QP2010S (Figura 20). Se empleó una columna cromatográfica capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m df). El analizador se operó en modo *full scan* (35-700 uma) a 70 eV en modo impacto electrónico EI. La temperatura de la fuente de iones fue 230°C, la temperatura de interfase fue 300°C. La inyección se realizó en modo *splitless* a 280°C. El gas de arrastre empleado fue Helio UAP 5.0 (Linde) a un flujo de 1 mL.min⁻¹. El volumen de inyección fue de 1,0 μ L del extracto reconstituído en 1,0 mL de diclorometano grado HPLC.

La cuantificación de las muestras se realizó mediante el método del estándar interno. Para ello se adicionó 100 μ L de solución patrón estándar interno (cafeína) 2000 ppm con el fin de cuantificar la concentración de alcaloides en función de su área cromatográfica; así como determinar el porcentaje de recuperación de la cafeína y determinar si existe degradación de compuestos en la hidrólisis.

La identificación de alcaloides se realizó mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos empleando las bases de datos NIST y Wiley 239. El análisis de datos se realizó empleando el software Labsolutions (shimadzu corporation).

Figura 20. Cromatógrafo de gases-masas Shimadzu GC-MS QP2010.



Fuente: Esta investigación.

De manera complementaria se realizó una reacción de derivatización con el fin de identificar alcaloides no volátiles en las muestras. Este procedimiento se realizó en un equipo Eyela MG-2200 como el que se muestra en la figura 21, empleando como agente derivatizante MSTFA a una temperatura de 60°C durante 30 minutos como lo reporta Valdés A. *et al.* (2015)⁷⁷; posteriormente se inyectaron las muestras derivatizadas por GC-MS bajo las mismas condiciones de inyección. Los derivados TMS de alcaloides de yerbamora han sido reportados por Eanes R. *et al.* (2014).⁷⁸

Figura 21. Bloque térmico de temperatura ajustable Eyela MG-2200.



Fuente: Esta investigación.

⁷⁷ Valdés A., Sullini G., Ibáñez E., Cifuentes A., García-Cañas V. Rosemary polyphenols induce unfolded protein response and changes in cholesterol metabolism in colon cancer cells. *En: Journal of Functional Foods* (2015). vol. 15, p. 29-439.

⁷⁸ Eanes R., Tek N. Solid-phase microextraction (SPME) followed by On-fiber derivatization of solasodine and solanidine aglicones of steroidal glycoalkaloids. *En: Journal of liquid chromatography & related technologies* (2014). vol. 31, p. 1132-1146.

3.8. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC

Para el análisis por HPLC, las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia Waters Breeze HPLC con loop de 20 μL , inyector manual Rheodyne 7225I, fase móvil (acetonitrilo : agua-ácido fórmico 0,1%) a flujo de 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, usando una columna analítica Waters X-terra (150 mm x 4,6 mm x 5,0 μm) termostatzada a 30°C. Se utilizó un detector de fotoarreglo de diodos PDA Waters 2998 a longitudes de onda de 208 y 294 nm. La separación se realizó en modo gradiente, el cual se determinó realizando varios ensayos siguiendo el gradiente propuesto por Bai Y. (2012).⁷⁹ El extracto se concentró con nitrógeno gaseoso y se diluyó en fase móvil. En la tabla 4 se muestra el gradiente de separación del análisis.

Tabla 4. Gradiente de separación en el análisis HPLC-PDA para el extracto de alcaloides de hojas de yerbamora.

Tiempo (min)	Flujo ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	%A	%B
0	0,5	95	5
10	0,5	25	75
11	0,5	5	95
16	0,5	95	5
20	0,5	95	5

A: ácido fórmico 0,1% acuoso.

B: acetonitrilo.

Fuente: Esta investigación.

3.9. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas LC-MS/MS IT

Se realizó un análisis por LC-MS/MS en las instalaciones del laboratorio FOODOMICS del instituto de ciencias de la alimentación de la Universidad Autónoma de Madrid (CIAL-CSIC).

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida Agilent 1200 con detector DAD y acoplado a un espectrómetro de masas tandem de trampa de iones (LC/MS-IT) Agilent 6320 equipado con interfase electrospray (ESI) e inyector automático. La columna empleada fue Agilent Zorbax eclipse (150 mm x 4,6 mm x 3,5 μm).

Las condiciones de operación del detector de masas fueron: Drying gas (N_2) a un flujo de 8.0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ a temperatura de 300°C. Nebulizador 40 psi; Voltaje del

⁷⁹ Bai Y. *et al.* (2012). *op. cit.* p. 3632-3639.

capilar 3000 V. Rango de masas 100-900. Interfase ESI operado en modo negativo y positivo. La adquisición de datos se realizan con el software LC/MS Ion trap system 6320 series de Agilent. Los espectros de masas se analizaron empleando la base de datos Mass Bank.⁸⁰

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación del método de extracción

Se analizaron los datos de los extractos de yerbamora analizadas por GC-MS para los tres métodos de extracción. El criterio para determinar el método más eficiente en la extracción de alcaloides en las muestras de estudio, fue el número de alcaloides totales identificados y su área relativa expresada en concentración por mg/g de muestra.

Los ensayos del método de extracción más eficiente solo se realizaron para la variedad proveniente de Obonuco debido a la disponibilidad de muestras.

El promedio de los tres ensayos para cada método de extracción significa el número de picos cromatográficos correspondientes a diversos alcaloides identificados, los valores se registran en la tabla 5.

Tabla 5. Número de picos cromatográficos correspondientes a alcaloides obtenidos en los tres tipos de extracción.

Método de extracción	Número de picos cromatográficos				s	% CV
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	promedio		
HA	24	25	22	24	1,527	6,45
HB	9	8	11	9	1,527	16,37
EUA	12	13	12	12	0,577	4,68

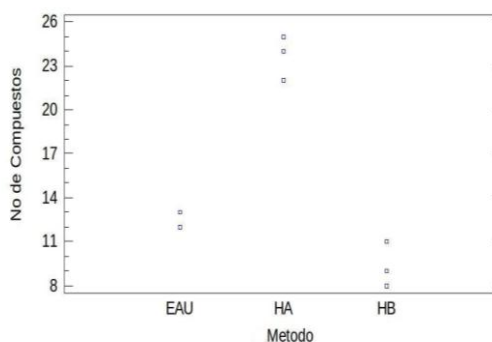
Fuente: Esta investigación.

La tabla 5 indica que entre los tres métodos de extracción, la hidrólisis ácida presenta mayor promedio de número de alcaloides extraídos.

Respeto al % CV, la dispersión de datos es menor en la EUA. La EUA se caracteriza por ser un método de extracción que presenta menos pasos en el proceso en relación con HA y HB, lo cual significa que se minimizan los errores en el proceso de preparación de la muestra.

La gráfica 1 indica la dispersión de los datos y el número de alcaloides extraídos en las 3 réplicas de cada método.

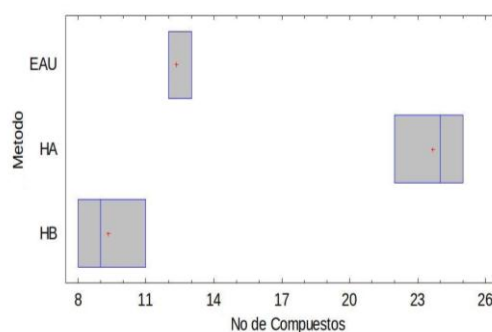
Gráfica 1. Dispersión por código de nivel para número de alcaloides.



Fuente: Esta investigación.

La relación entre el número de alcaloides extraídos en los tres métodos así como la dispersión de los datos se puede apreciar con la gráfica 2 de caja y bigotes:

Gráfica 2. Caja y bigotes para número de alcaloides.



Fuente: Esta investigación.

El número de alcaloides totales extraídos en cada uno los tres métodos no es el único criterio a tener en cuenta para la elección del método de extracción, también fue necesario comparar la concentración total de alcaloides identificados en los tres métodos de extracción. Estos datos se expresan en la tabla 6.

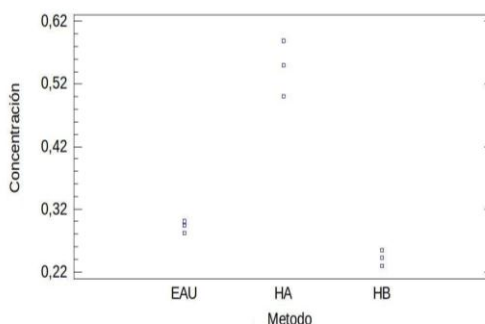
Tabla 6. Concentración total de alcaloides comunes en mg/g para los tres métodos de extracción.

Método de extracción	Concentración total de alcaloides (mg/g)				s	% CV
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio		
HA	0,589	0,550	0,500	0,546	0,0446	8,16
HB	0,243	0,229	0,254	0,242	0,01256	5,18
EUA	0,281	0,300	0,294	0,292	0,0097	3,33

Fuente: Esta investigación.

El método que reportó mayor concentración de alcaloides fue HA, sin embargo también fue el que tuvo mayor variación en los datos. La gráfica 3 muestra la relación entre la concentración (mg/g) de alcaloides totales y la dispersión de los datos.

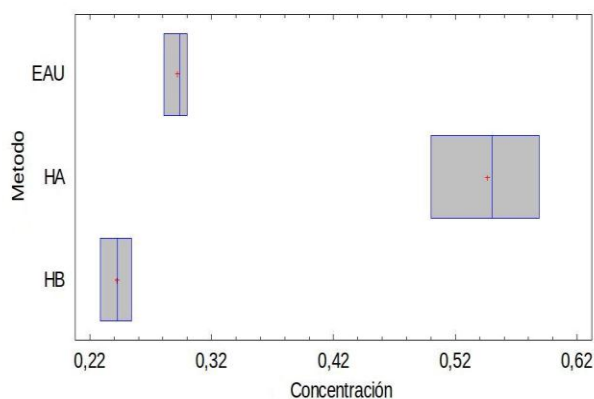
Gráfica 3. Dispersión por código de nivel para concentración de alcaloides en mg/g.



Fuente: Esta investigación.

La dispersión de los datos en HA puede ser causa del número de pasos en el proceso de extracción, la cual es mayor si se compara con HB y EUA. La extracción por hidrólisis ácida, a pesar de ser un proceso de extracción más complejo que HB y EUA, extrae mayor concentración de alcaloides, tal como lo indica la gráfica 4 de caja y bigotes.

Gráfica 4. Caja y bigotes para concentración de alcaloides en mg/g.



Fuente: Esta investigación.

Resulta evidente que el mejor método de extracción para alcaloides en hojas de *Solanum nigrum L.*, corresponde a la hidrólisis ácida, ya que el promedio de las tres réplicas realizadas indican más alcaloides extraídos y mayor concentración.

Se sabe que la HA en muestras vegetales favorece el rompimiento de la pared celular lo cual permite la liberación de los componentes alcaloidales, además los alcaloides pueden protonarse en medio ácido formando sales hidrosolubles.⁸¹ La hidrólisis básica y la extracción asistida por ultrasonido presentaron condiciones más débiles en la extracción de alcaloides en hojas de *Solanum nigrum*.

4.2. Comparación de los métodos de extracción en muestras vegetales desengrasadas y sin desengrasar

El desengrase de las muestras vegetales se realiza con el fin de remover materia grasa de las hojas la cual impide separar fácilmente las fases acuosa y orgánica en la decantación ya que se forman emulsiones. Sin embargo, en el proceso de desengrase pueden perderse algunos alcaloides según su naturaleza, tal es el caso de los alcaloides esteroidales los cuales al presentar en su estructura el esqueleto base de esterano (ciclopentanoperhidrofenantreno), hace que sean muy afines a los solventes usualmente usados en el desengrase.⁸²

En el presente trabajo se contrastó la extracción de alcaloides empleando material vegetal desengrasado y sin desengrasar. Se realizó el análisis de varianza respecto al número de alcaloides y la concentración total de alcaloides similares en el tratamiento de desengrase y sin desengrasar. Los datos de los procesos sometidos a desengrasado y sin desengrase se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Número de alcaloides en el proceso de desengrase y sin desengrasar.

HA de muestras	Número de picos cromatográficos				s	% CV
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	promedio		
Desengrasadas	21	23	23	22	1,155	5,17
Sin desengrasar	24	22	24	23	1,155	4,95

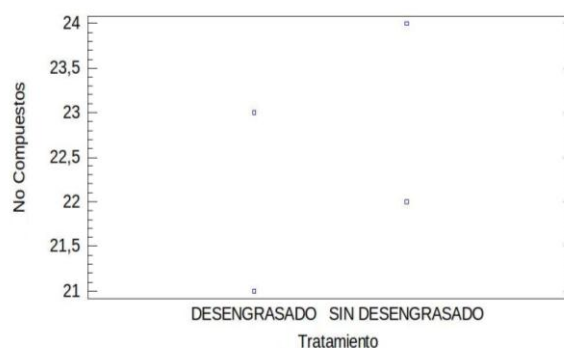
Fuente: Esta investigación.

El análisis de varianza presentado en la tabla 7 mostró que ambos tratamientos de muestra (desengrase y no desengrasar) no presentan diferencias significativas. La dispersión de datos en el tratamiento de muestras con y sin desengrase es la misma (diferencia de 2 alcaloides), sin embargo, respecto a la media, el coeficiente de variación es menor en muestras sin desengrasar; además que el valor de número de alcaloides en promedio es mayor en una unidad. Con los valores de la tabla 7 se procedió a realizar las gráficas 5 y 6.

⁸¹ Hoebler C., Barry J., David A., Delort-Laval J. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1989). vol. 37, p. 360-367.

⁸² Arango G. (2008). op, cit. p. 12.

Gráfica 5. Dispersión por código de nivel para número de alcaloides en el desengrase.

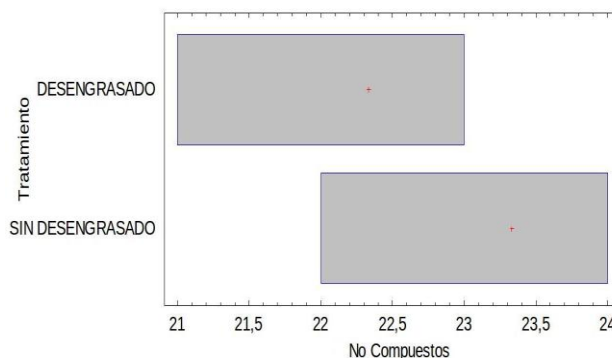


Fuente: Esta investigación.

En las gráficas 5 y 6 se puede observar una gran dispersión en el número de alcaloides, esto se debe a que el número de alcaloides es una variable discreta (toma valores enteros). En ambas gráficas se puede observar que el proceso sin desengrasar resulta mejor a pesar que no hayan diferencias significativas entre los tratamientos, esto se evidencia ya que el proceso sin desengrasar extrajo 23 compuestos en promedio de las tres réplicas para la variedad proveniente de Obonuco, mientras que el proceso desengrasado extrajo 22 alcaloides. Posteriormente (numeral 4,4) se identificó la 9-octadecenamina como el compuesto que aparece en muestras sin desengrasar pero no en muestras desengrasadas.

Además de esto, se estableció que los cromatogramas obtenidos en los procesos desengrasados y sin desengrasar presentan similitudes (ver anexo F), lo cual puede inferir que el desengrase no afecta la reproducibilidad de los datos cromatográficos.

Gráfica 6. Caja y bigotes para número de alcaloides en el tratamiento de desengrase.



Fuente: Esta investigación.

De la misma manera, la tabla 8 relaciona el tratamiento de desengrase de las muestras respecto a la concentración total de alcaloides similares identificados para ambos procesos.

Tabla 8. Concentración total de alcaloides comunes en mg/g para el proceso de desengrase y sin desengrasar.

HA de muestras	Concentración total de alcaloides (mg/g)				s	% CV
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	promedio		
Desengrasadas	4,666	4,514	4,601	4,594	0,076	1,66
Sin desengrasar	5,571	5,489	5,533	5,531	0,041	0,74

Fuente: Esta investigación.

A diferencia de la relación de número de alcaloides respecto al tratamiento de desengrase, la ANOVA de la concentración de alcaloides presentó diferencias significativas: el promedio de la concentración de alcaloides en mg/g fue mayor en muestras sin desengrasar y el valor de desviación de datos es menor que el tratamiento de desengrase. Este comportamiento se puede observar mejor mediante la gráfica 7.

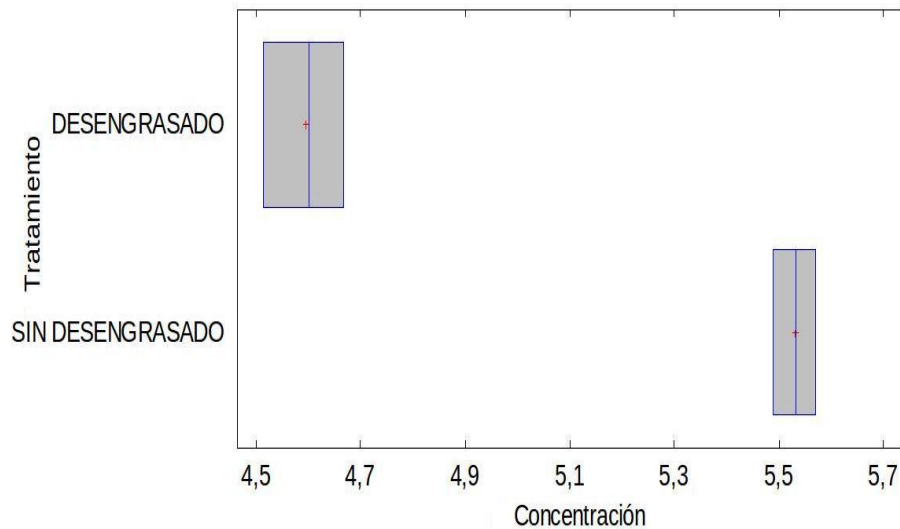
Gráfica 7. Dispersión por código de nivel para concentración de alcaloides en el tratamiento de desengrase.



Fuente: Esta investigación.

Así mismo, la gráfica 8 de caja y bigotes muestra claramente que no desengrasar la muestra da como resultado mayor concentración de alcaloides en mg/g.

Gráfica 8. Caja y bigotes para concentración de alcaloides en el tratamiento de desengrase.



Fuente: Esta investigación.

Los resultados obtenidos para el método de extracción HA indican que si bien, el desengrasado facilita la extracción en el procedimiento líquido-líquido al no formar suspensiones y facilita la interpretación de datos cromatográficos al remover impurezas, el no desengrasar las muestras ahorra tiempo en el análisis, costos de solventes; reduce la contaminación por uso de solventes tóxicos como el n-Hexano mitigando el impacto medioambiental y la salud del analista, por otro lado aumenta la eficiencia de la extracción al reducir un paso en el proceso de preparación de las muestras en el cual se pueden perder analitos.

Los ANOVAS de las tablas 7 y 8 indican que no se presentó diferencia estadísticamente significativa entre ambos procesos, sin embargo se encontró mayor concentración de compuestos y mayor número de picos cromatográficos en muestras sin desengrasar.

Respecto a la formación de emulsiones, se pudo controlar este inconveniente por adición de cloruro de sodio acuoso al 10%, lo cual facilitó la separación de fases en los procesos de extracción, como lo indica la figura 22.

Figura 22. Emulsión formada en el proceso de extracción sin desengrasar.



Fuente: Esta investigación.

4.3. Optimización de condiciones de extracción de alcaloides

Establecido el método de extracción de alcaloides más adecuado (HA) y sin desengrasar las muestras vegetales, se optimizaron las condiciones de extracción; la metodología de superficie de respuesta (MRS) determinó las condiciones adecuadas de extracción influenciadas por los factores: concentración de ácido sulfúrico (0,5; 1,0 y 2,0 M) en etanol y el tiempo de extracción (4, 6 y 8 horas).

El mayor rendimiento de extracción respecto a número de alcaloides y su concentración en miligramos de alcaloides totales por gramo de hojas son funciones de los niveles de cada uno de los factores experimentales, estos valores se presentan en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Número de picos cromatográficos correspondientes a alcaloides en la optimización de las condiciones de extracción.

Concentración de H_2SO_4	Número de alcaloides identificados		
	4 horas	6 horas	8 horas
0,5 M	6	5	7
1,0 M	8	5	10
2,0 M	22	14	25

*n=3

Fuente: Esta investigación.

Tabla 10. Concentración total de alcaloides por gramos de hojas en la optimización de las condiciones de extracción.

Concentración de H_2SO_4	Concentración de alcaloides identificados (mg/g)		
	4 horas	6 horas	8 horas
0,5 M	0,334	0,452	0,526
1,0 M	0,426	0,575	1,030
2,0 M	1,291	1,125	1,313

*n=3

Fuente: Esta investigación.

4.3.1. Efectos estimados para número de alcaloides

Relacionando los valores de la tabla 9, se determinaron mediante pruebas del valor-P las estimaciones para los efectos experimentales tiempo de hidrólisis y concentración de ácido, además de las interacciones entre dichos efectos con el fin de establecer el error estándar. Los valores se expresan en la tabla 11.

Tabla 11. Efectos estimados para el número de alcaloides.

Efecto	Estimado del número de alcaloides*	Error Estándar.
Promedio global del análisis cromatográfico	5,13889	2,38407
A: Concentración molar de H_2SO_4 .	13,6667	2,37788
B: Tiempo de hidrólisis en horas	2,5	2,39902
AA	6,5	4,71846
AB	1,5	2,85982
BB	10,3333	4,11861

*Valores mínimos ajustados al diseño experimental.

Errores estándar con 3 GL.

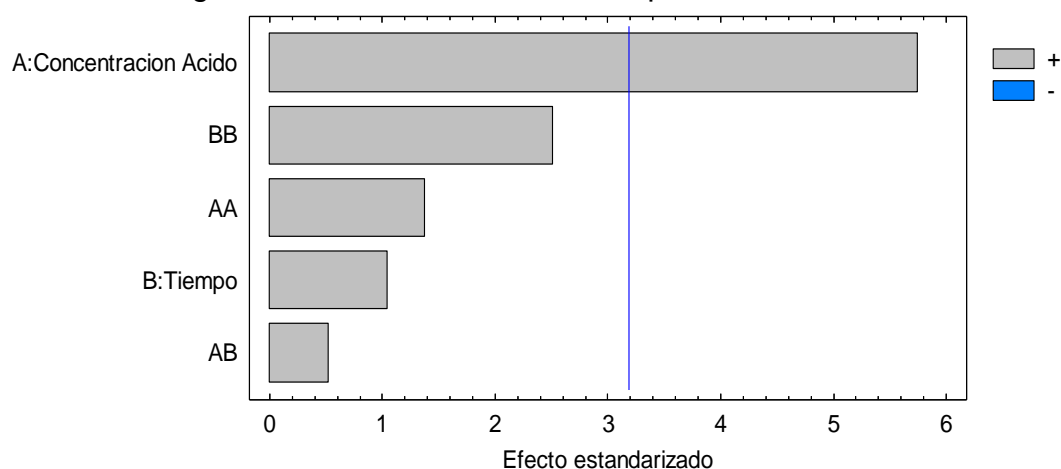
Fuente: Esta investigación.

La tabla indica el error estándar relativo de los datos experimentales lo cual mide cuán dispersos están los valores; como se puede observar, los valores tienen un porcentaje de variación bajo ($\leq 5\%$).

El valor del estimado permite determinar el comportamiento de los factores

determinantes; en este caso se encontró que para la extracción de alcaloides respecto a número de compuestos, el factor determinante fue la concentración de ácido; este factor presenta un efecto de aumento positivo (+) en la extracción de alcaloides (número de alcaloides totales). Dicho factor determinante se puede apreciar mejor en el diagrama de Pareto (gráfica 9).

Gráfica 9. Diagrama de Pareto estandarizado para la extracción de alcaloides.



Fuente: Esta investigación.

Para determinar la significancia estadística de los efectos, se realizó un análisis de varianza, como se indica en la tabla 12.

Tabla 12. Análisis de Varianza para número de alcaloides.

Factores experimentales	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Molaridad de H ₂ SO ₄	280,167	1	280,167	33,03	0,0105
B: Horas de hidrólisis	9,21053	1	9,21053	1,09	0,3740
AA	16,0952	1	16,0952	1,90	0,2621
AB	2,33333	1	2,33333	0,28	0,6362
BB	53,3889	1	53,3889	6,29	0,0870
Error total	25,4444	3	8,48148		
Total (corr.)	422,889	8			

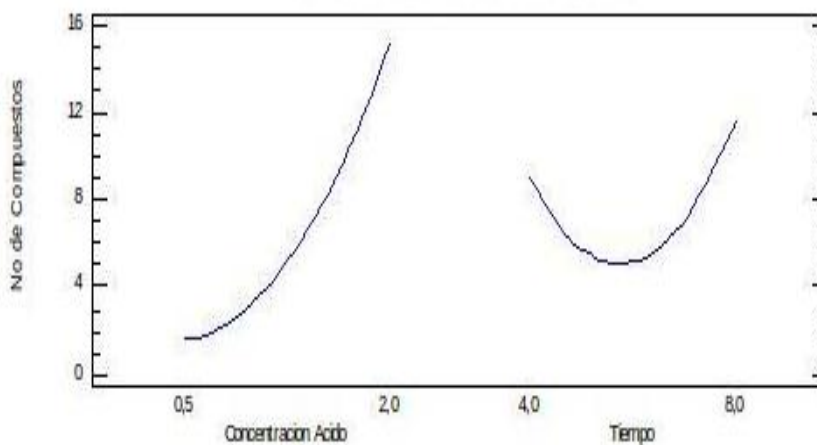
GL: Grados de libertad.

Fuente: Esta investigación.

Como se puede ver en la tabla 12, el efecto que tiene un valor-P menor que 0,05 (0,0105) indica que para el número de alcaloides el único factor estadísticamente significativo diferente de cero (respecto al valor-P) es la concentración de ácido sulfúrico con un nivel de confianza del 95,0 %, por lo tanto se puede afirmar que es el único factor principal que influye positivamente respecto al número de alcaloides totales extraídos.

Se determinó que el aumento del número de alcaloides en la extracción se presenta en niveles altos de ácido sulfúrico (2,0 M) y tiempo (8 h). Esto se puede evidenciar en la gráfica 10, de factores principales la cual relaciona los factores tiempo y concentración con el promedio del número de alcaloides aislados. Este valor y el gráfico concuerdan con lo reportado en literatura respecto a los tiempos de extracción óptimos de 4 y 8 horas.⁸³

Gráfica 10. Efectos principales para número de alcaloides.



Fuente: Esta investigación.

En el factor tiempo se puede evidenciar un valor mínimo en promedio para tres réplicas registrado a 6 horas de extracción; una de las posibles causas de este fenómeno es que la mezcla de extracción ácido sulfúrico-etanol era una mezcla no azeotrópica, posiblemente a 6 horas disminuye el equilibrio de extracción entre solventes y solutos.⁸⁴ También puede ser causa de un excesivo rompimiento de la membrana de organelos como vacuolas a 6 horas que libere compuestos como enzimas, las cuales afecten el equilibrio de extracción,⁸⁵ sin embargo estas sólo son hipótesis planteadas, las causas aún son desconocidas.

⁸³ Lancaster J. *et al.* (1975), p. 139.

⁸⁴ Visth S., Chatuverdi S. Isolation of Natural Products. *En:* Current Pharma Research (2012). vol. 2, p. 584-599.

⁸⁵ Grabber J. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *En:* Crop Science (2005). vol. 45, p. 820-831.

Este fenómeno en donde la extracción de compuestos no presenta un comportamiento lineal también se va visto en otros estudios como lo reportan Chew K. *et al.* (2011)⁸⁶ y Hismath I. *et al.* (2011).⁸⁷

El análisis de varianza permitió establecer el factor experimental principal que hay que tener en cuenta para optimizar el proceso de extracción de alcaloides, los cuales presentan un modelo ajustado de segundo orden que permiten predecir la tendencia o comportamiento a seguir para alcanzar las condiciones óptimas; estos valores se expresan en la tabla 13.

Tabla 13. Coeficientes de regresión para número de alcaloides.

Coeficiente	Estimado*
Constante	49,2778
A: Concentración molar de H ₂ SO ₄	-8,33333
B: Tiempo de hidrólisis en horas	-15,5
AA	5,77778
AB	0,5
BB	1,29167

*Valores mínimos ajustados al diseño experimental.

Fuente: Esta investigación.

Con estos valores se puede construir la ecuación del modelo ajustado, la cual indica la relación entre el número de alcaloides extraídos en función de los dos factores experimentales principales:

$$N_A = 49,2778 - 8,33333 C_A - 15,5 t + 5,77778 C_A^2 + 0,5 C_A t + 1,29167 t^2$$

Ecuación 3

En donde:

N_A: Número de alcaloides totales.

C_A: Concentración molar de ácido sulfúrico.

t: Tiempo de extracción en horas.

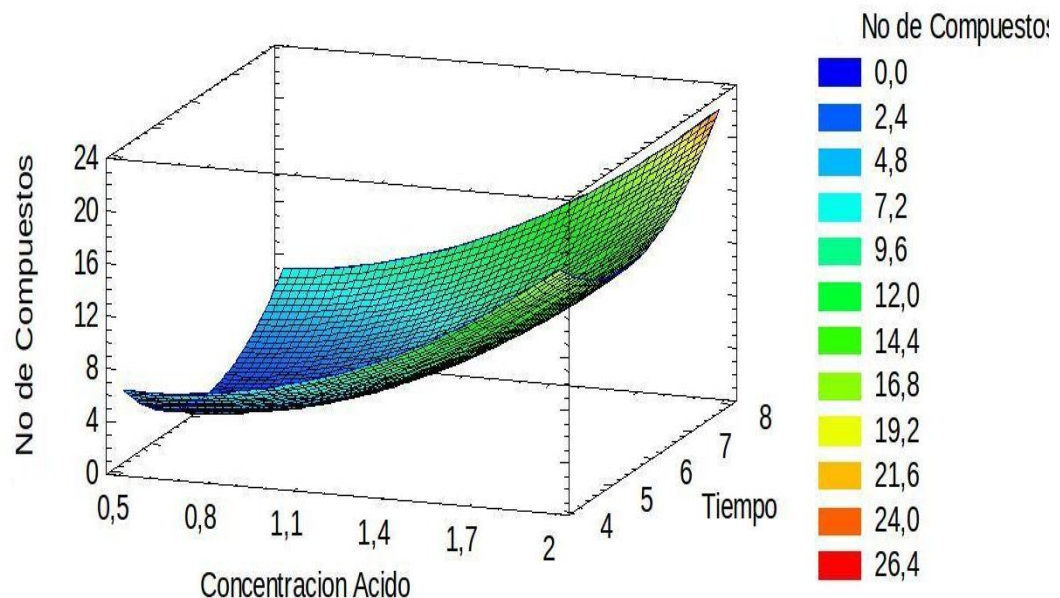
⁸⁶ Chew K., Ng S., Thoo Y., Khoo Z., Wan W., Ho C. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. En: International food research journal (2011). vol. 18, p. 571-578.

⁸⁷ Hismath I., Wan W., Ho C. Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves. En: International food research journal (2011). vol. 18, p. 931-939.

A pesar que la concentración de ácido es el factor determinante y significativo estadísticamente para la extracción de alcaloides, el tiempo también influye en los valores, por esa razón la ecuación 3 relaciona la concentración de ácido sulfúrico extractor con el tiempo de extracción.

Con estos datos realizó un gráfico de superficie de respuesta estimada para el número de alcaloides, el cual expresa las condiciones óptimas de deseabilidad (mayor número de alcaloides) respecto a los factores experimentales, según lo indica la gráfica 11.

Gráfica 11. Superficie de respuesta estimada para número de alcaloides.



Fuente: Esta investigación.

4.3.2. Efectos estimados para concentración de alcaloides

De la misma forma que en el numeral 4.3.1, con los datos de la tabla 10 se determinaron las estimaciones para los efectos experimentales respecto a la concentración de alcaloides en miligramos por gramos de hojas de *Solanum nigrum*. Los datos se resumen en la tabla 14.

Tabla 14. Efectos estimados para concentración de alcaloides en mg/g.

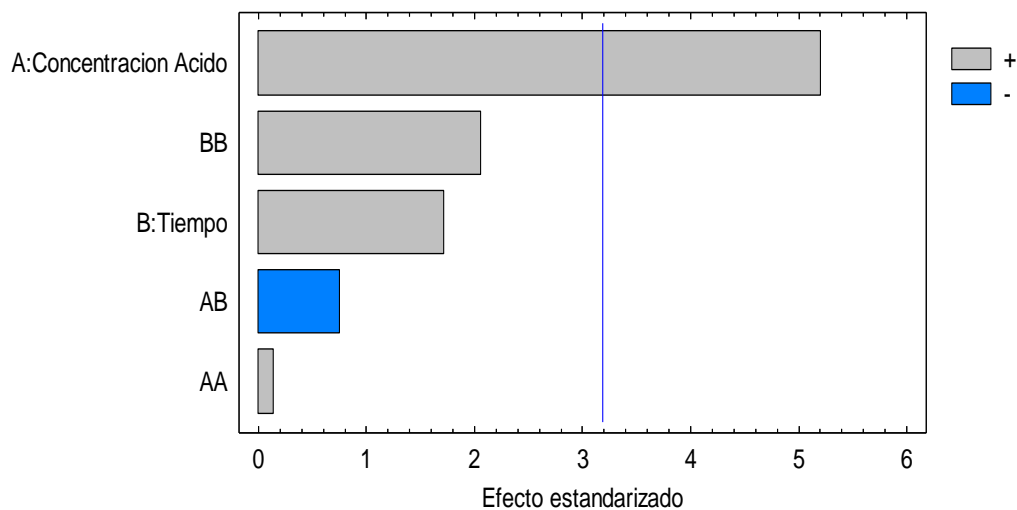
Efecto	Estimado concentración de alcaloides*	Error Estándar.
Promedio global del análisis cromatográfico	0,494417	0,149144
A: Concentración molar de H ₂ SO ₄ .	0,774333	0,148757
B: Tiempo de hidrólisis en horas	0,257643	0,150079
AA	0,0415	0,29518
AB	-0,135214	0,178906
BB	0,532	0,257654

*Valores mínimos ajustados al diseño experimental.

Fuente: Esta investigación.

La tabla 14 indica que el error estándar es muy bajo, por lo tanto la dispersión de los datos es mínima. Al igual que para el número de alcaloides, para la extracción de alcaloides respecto a su concentración se encontró que el factor determinante fue la concentración de ácido; este factor presenta un efecto de aumento (+). En el diagrama de Pareto (gráfica 12), se observa que la interacción molaridad de ácido sulfúrico y tiempo tienen un efecto negativo (-), sin embargo este efecto no es significativo para la variable de respuesta concentración de alcaloides (mg/g).

Gráfica 12. Diagrama de Pareto estandarizado para la extracción de alcaloides.



Fuente: Esta investigación

Se determinó la significancia estadística de los efectos mediante una ANOVA, como se indica en la tabla 15.

Tabla 15. Análisis de Varianza para concentración de alcaloides.

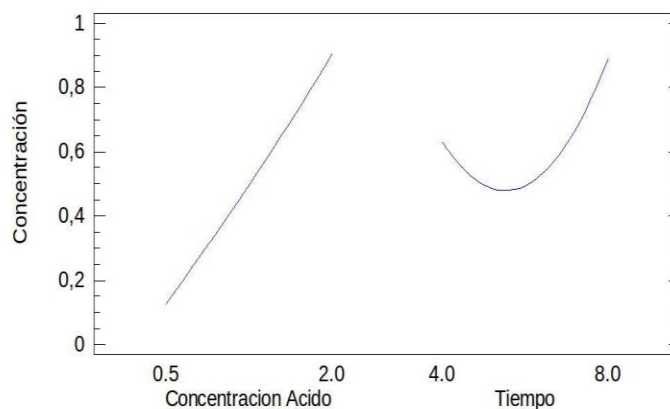
Factores experimentales	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Molaridad de H ₂ SO ₄	0,899388	1	0,89938	27,10	0,0138
B: Horas de hidrólisis	0,0978229	1	0,097822	2,95	0,1845
AA	0,000656095	1	0,000656	0,02	0,8971
AB	0,01896	1	0,01896	0,57	0,5047
BB	0,141512	1	0,141512	4,26	0,1309
Error total	0,0995786	3	0,03319		
Total (corr.)	1,31447	8			

Fuente: Esta investigación.

La concentración de ácido sulfúrico en la hidrólisis ácida es el único factor que influye positivamente para obtener mayor concentración de alcaloides en la extracción por HA. Lo anterior se observa en el valor-P menor que 0,05 (0,0138) con un nivel de confianza del 95%.

La gráfica de efectos principales (gráfica 13) permite establecer el efecto de la concentración de ácido sulfúrico respecto a la variable de respuesta del estudio.

Gráfica 13. Efectos principales para concentración de alcaloides.



Fuente: Esta investigación.

Por lo tanto se puede concluir que tanto la concentración de alcaloides como el número de alcaloides que se obtienen en la extracción por HA dependen principalmente de la concentración de ácido sulfúrico. Al igual que en el número de alcaloides, la concentración de alcaloides presentó un efecto no lineal respecto al tiempo de extracción, observándose un mínimo a 6 horas.

Se estableció el factor experimental principal mediante el análisis de ANOVA, el cual hay que tener en cuenta para optimizar el proceso de extracción de alcaloides; estos valores se expresan en la tabla 16.

Tabla 16. Coeficientes de regresión para concentración de alcaloides.

Coeficiente	Estimado*
Constante	1,57628
A: Concentración molar de H ₂ SO ₄	0,694429
B: Tiempo de hidrólisis en horas	-0,67725
AA	0,0368889
AB	-0,0450714
BB	0,0665

*Valores mínimos ajustados al diseño experimental.

Fuente: Esta investigación.

Con estos valores se puede construir la ecuación del modelo ajustado, que indica la relación entre la concentración de alcaloides extraídos en función de los dos factores experimentales principales:

$$[A]=1,57628+0,694429C_A-0,67725t+0,0368889C_A^2+0,0450714C_At+0,0665t^2$$

Ecuación 4

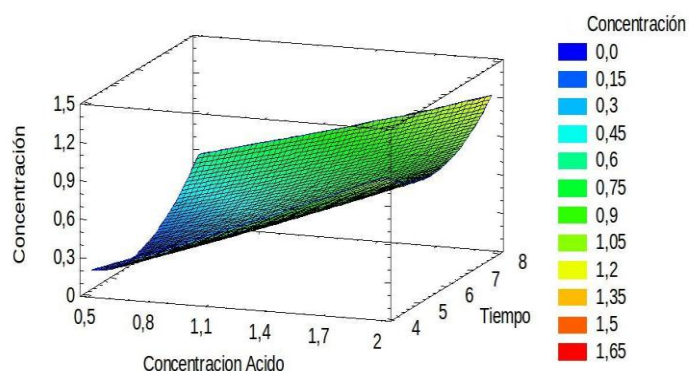
En donde:

[A]: Concentración de alcaloides totales en mg/g.

C_A: Concentración molar de ácido sulfúrico.

t: Tiempo de extracción en horas.

Gráfica 14. Superficie de respuesta estimada para concentración de alcaloides.



Fuente: Esta investigación.

La gráfica 14 indica el diagrama de superficie de respuesta el cual expresa las condiciones óptimas de deseabilidad (mayor concentración de alcaloides en la extracción por HA) respecto a los factores experimentales. Como se puede observar, a medida que aumenta el tiempo de extracción y la concentración de ácido, aumenta la concentración de alcaloides, sin embargo respecto al factor tiempo la relación no es directamente proporcional. Esto concuerda con los datos obtenidos en el análisis de efectos estimados para número de alcaloides.

4.3.3. Optimización del diseño

Los experimentos realizados variando las interacciones de los factores se expresan en la tabla 17.

Tabla 17. Interacciones de factores y efectos en los experimentos.

Experimento	H ₂ SO ₄ (M)	Tiempo (horas)	Alcaloides	Concentración (mg/g)
1	1	6	4	0,355
2	1	8	9	0,942
3	0,5	6	4	0,232
4	1	4	7	0,338
5	2	4	20	1,203
6	2	6	12	0,811
7	2	8	24	1,225
8	0,5	8	6	0,438
9	0,5	4	5	0,246

Fuente: Esta investigación.

Con estos datos se procedió a realizar la matriz del diseño experimental que indique las condiciones óptimas en la extracción de alcaloides de las hojas de yerbamora mediante hidrólisis ácida, según lo indica la tabla 18.

Tabla 18. Matriz del diseño experimental.

Experimento	Concentración de alcaloides (mg/g)	No. de alcaloides	Deseabilidad	
			Prevista	Observada
1	0,355	4,0	0,0	0,0
2	0,942	9,0	0,459913	0,485283
3	0,232	4,0	0,0	0,0
4	0,338	7,0	0,285875	0,225167
5	1,203	20,0	0,848201	0,894427
6	0,811	12,0	0,711554	0,569561
7	1,225	24,0	0,958877	1,0
8	0,438	6,0	0,308423	0,209284
9	0,246	5,0	0,148163	0,110905

Fuente: Esta investigación.

Esta matriz ayuda a determinar la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas; dichas respuestas presentan un valor de deseabilidad el cual indica el experimento que asegure óptimas condiciones de extracción de alcaloides.

La tabla 18 muestra que el experimento 7 presentaba las condiciones más favorables en la extracción de alcaloides en hojas de *Solanum nigrum* debido a su valor de deseabilidad prevista (0,958877).

Las condiciones de tiempo de extracción y concentración de ácido sulfúrico en la hidrólisis ácida para una adecuada extracción de alcaloides se registran en la tabla 19.

Tabla 19. Optimización de deseabilidad.

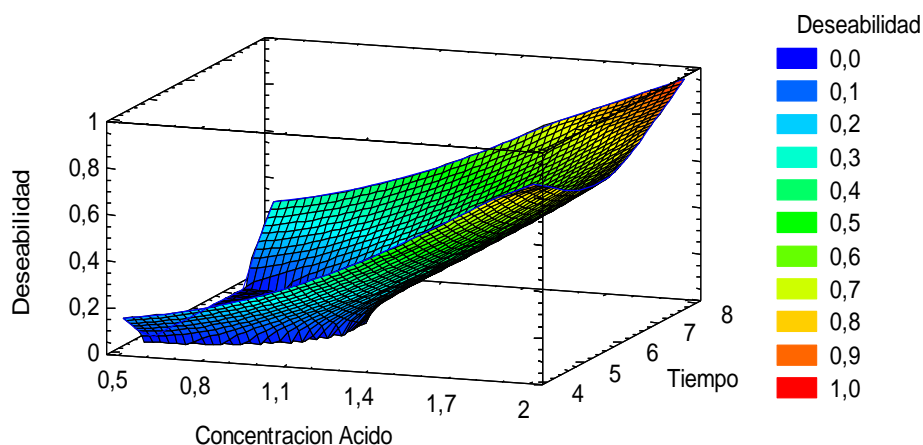
Factor	Valor bajo	Valor alto	Valor óptimo
Concentración molar de H_2SO_4	0,5	2,0	2,0
Horas de extracción	4,0	8,0	8,0
Respuesta	Valor óptimo		
Concentración de alcaloides (mg/g)	1,22955		
Número de alcaloides	22,3889		

Fuente: Esta investigación.

Los factores y variables de respuestas se pueden observar con el gráfico de superficie de respuesta estimada de deseabilidad (gráfica 15).

El valor de deseabilidad oscila entre 0,0 a 1,0, el valor mínimo indica que las condiciones experimentales no son suficientes para maximizar el valor de número de alcaloides y su concentración, por lo tanto la concentración de ácido y el tiempo de hidrólisis en los experimentos serán insuficientes; en contraste el valor máximo (1,0) indica que las condiciones de extracción son las adecuadas; de esta forma se establece que las mejores condiciones de extracción de alcaloides en hojas de *solanum nigrum* se dan a 8 horas de hidrólisis usando H_2SO_4 2,0 M en etanol.

Gráfica 15. Superficie de respuesta estimada para concentración de alcaloides.



Fuente: Esta investigación.

Entre los alcaloides identificados (ítem 4,4) aislados a 8 horas y que no estaban presentes a 4 ni 6 horas destacan (1-etil-2-metilpropil)-dimetilamina; benceno-etanamina; 2-[3-hidroxipropil]-5-pirrolidinona e higrina. La diferencia de los cromatogramas y los compuestos identificados se observan en los anexos D y F.

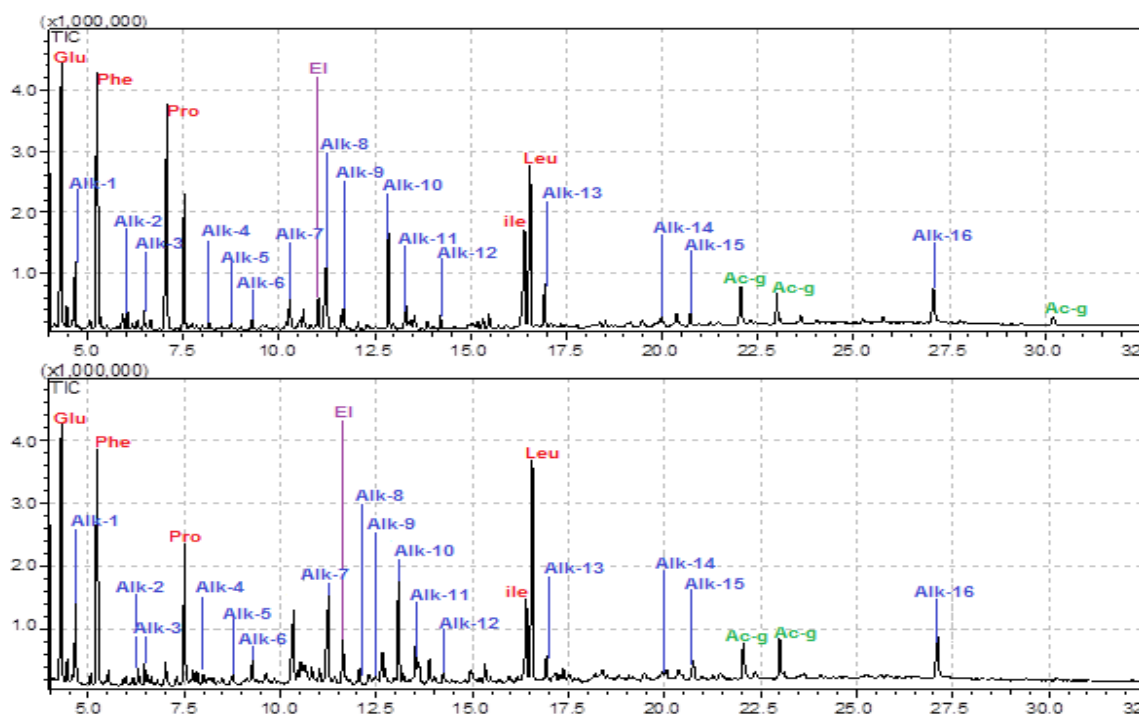
Establecidas las condiciones óptimas de extracción experimentales de alcaloides en la yerbamora, se procedió a realizar la extracción de alcaloides de un nuevo lote de muestras cuya recolección se describen en el ítem 3.1. Este procedimiento se realizó con el fin de identificar, cuantificar y comparar la variedad de *Solanum nigrum* proveniente de las dos zonas de recolección (Obonuco y Chachagüí).

4.4. Análisis de alcaloides de la yerbamora por GC-MS

El análisis de los cromatogramas de las dos variedades indica un total de 21 alcaloides para yerbamora proveniente de Chachagüí y 25 alcaloides para la variedad de Obonuco (el análisis de regiones y el número de alcaloides totales así como su cuantificación se tratará en el numeral 4.8 y anexos C y D).

Como se observa en la figura 23, los cromatogramas indican la similitud entre picos correspondientes a alcaloides extraídos de hojas de yerbamora de Chachagüí y Obonuco.

Figura 23. Cromatogramas TIC de GC-MS de alcaloides en variedades yerbamora de Chachagüí (superior) y Obonuco (inferior).



*Ac-g: ácidos grasos.

*EI: Estándar interno.

Fuente: Esta investigación.

Como se indica en la figura 23, además de los alcaloides también se identificaron

los aminoácidos Ácido glutámico, fenilalanina, prolina, isoleucina y leucina. Hay que tener en cuenta que los aminoácidos al presentar el grupo amino se comportan de forma similar a los alcaloides, por ende pueden protonarse en medio ácido; es así como se extraen en conjunto.

Además se encontraron ácidos grasos como el ácido palmitico, linoléico y oléico, teniendo en cuenta que el material vegetal no fue desengrasado.

Como se observa en el cromatograma, el número total de alcaloides mayoritarios y comunes que se encontraron en las dos variedades fueron 16, los cuales se registran en la tabla 20:

Tabla 20. Alcaloides mayoritarios identificados en hojas de yerbamora por GC-MS.

Alk	Compuesto	t _R (min)	Masa molecular (m/z)	Fragmentos (m/z)
1	5-Metil-2-pirrolidinona	4,676	99	41, 84, 99
2	4-heptanamina	6,300	115	55, 72
3	3,3-dimetil-2-butanamina	7,020	101	44
4	5-nonilamina	7,730	143	44, 85
5	2-pirrolidin-metanol	8,255	101	43, 70
6	1-metil-2-hidroxi-2-fenil-N,N-dimetil-etilamina	9,280	179	44, 72
7	2-(metoximetil)-pirrolidina	10,440	115	43, 70
8	4-(pirrolidin-2-ilcarbonil)-morfolina	11,630	184	43, 70
9	3-(2-metilpropil)-pirrolo[1,2]-pirazina	12,315	210	41, 70, 154
10	Ergocriptina	12,660	575	70, 125, 154
11	3,9-diazatriciclo-dodecan-2,8-diona	12,785	194	41, 70, 194
12	3-(dietilamino)-1,2-propanodiol	14,245	147	58, 86
13	2-[3-hidroxipropil]-5-pirrolidinona	17,170	143	41, 84
14	Ácido 4-Pirrolo benzazocina-carboxílico	20,060	244	115, 143
15	3-bencil-1,4-diaza-2,5-dioxobiciclo-nonano	20,750	244	70, 125, 244
16	9-Octadecenamida	27,100	281	58, 72

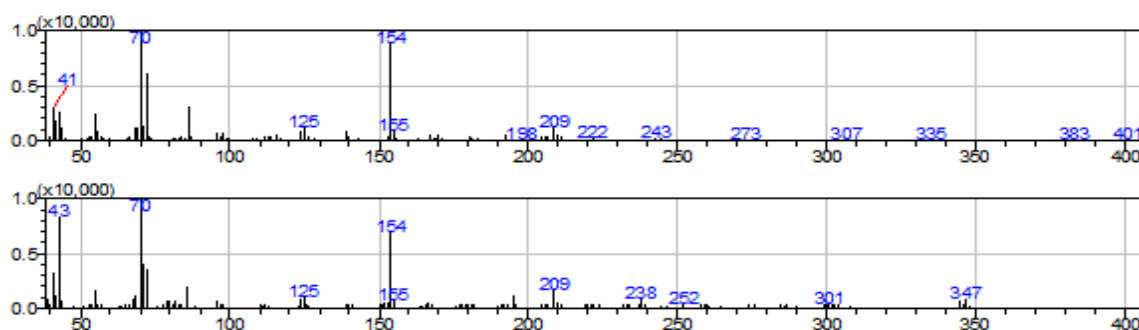
Fuente: Esta investigación.

Para identificar los alcaloides se analizaron sus espectros de masas en

comparación con los reportados en las bases de datos (NIST y Wiley 239) teniendo como criterio su pico base y las fragmentaciones con mayor intensidad. La comparación se realizó teniendo en cuenta que los compuestos mayoritarios cumplan al menos un 90% de similitud frente a los espectros reportados por las bases de datos.

Las figuras 24 a 31 indican el espectro de masas de algunos de los alcaloides mayoritarios (superior) y su respectiva comparación con los espectros proporcionados con las bases de datos (inferior). Los datos de los espectros de masas de los demás alcaloides se consignan en el anexo G y sus estructuras en el anexo E.

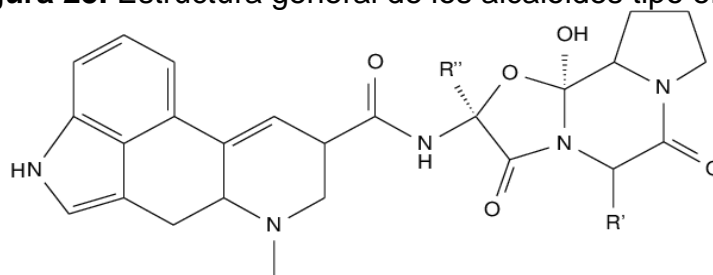
Figura 24. Espectro de masas de la Ergocriptina.



Fuente: Esta investigación.

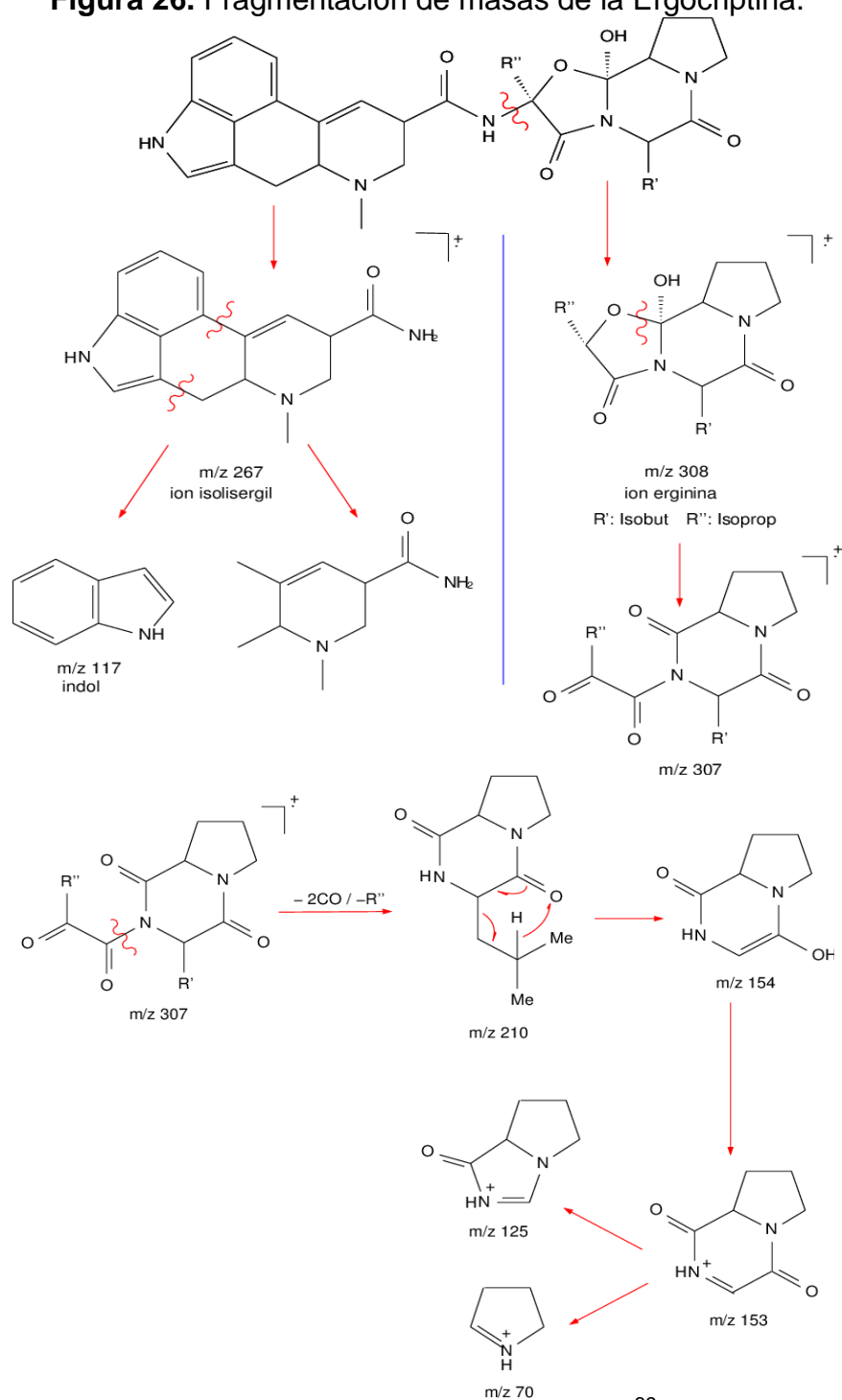
La ergocriptina es un alcaloide de tipo indólico de la familia de la ergotamina (figura 25). Este alcaloide se caracteriza por presentar un pico base en m/z 70 correspondiente al ion derivado de la pirrolidina; sus fragmentaciones más intensas en modo EI a 70 eV están en la relación m/z 125 para el ion de 2-ceto-1,4-diazabicyclo [3.3.0] octeno y 154 para la dicetopiperacina enolizada. La estructura en general de los alcaloides tipo ergot y sus fragmentaciones más comunes se pueden observar en las figuras 25 y 26.

Figura 25. Estructura general de los alcaloides tipo ergot.



Fuente: Vokoun, J. *et al.* (1975).⁸⁸

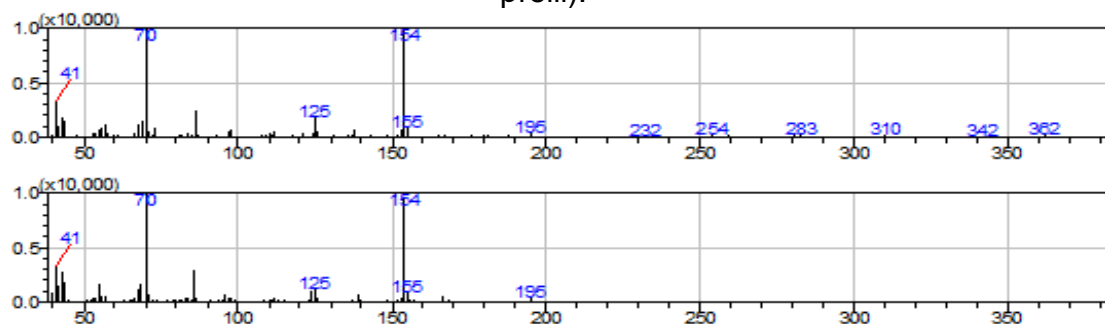
Figura 26. Fragmentación de masas de la Ergocriptina.



Fuente: Vokoun, J. *et al.* (1975).⁸⁹

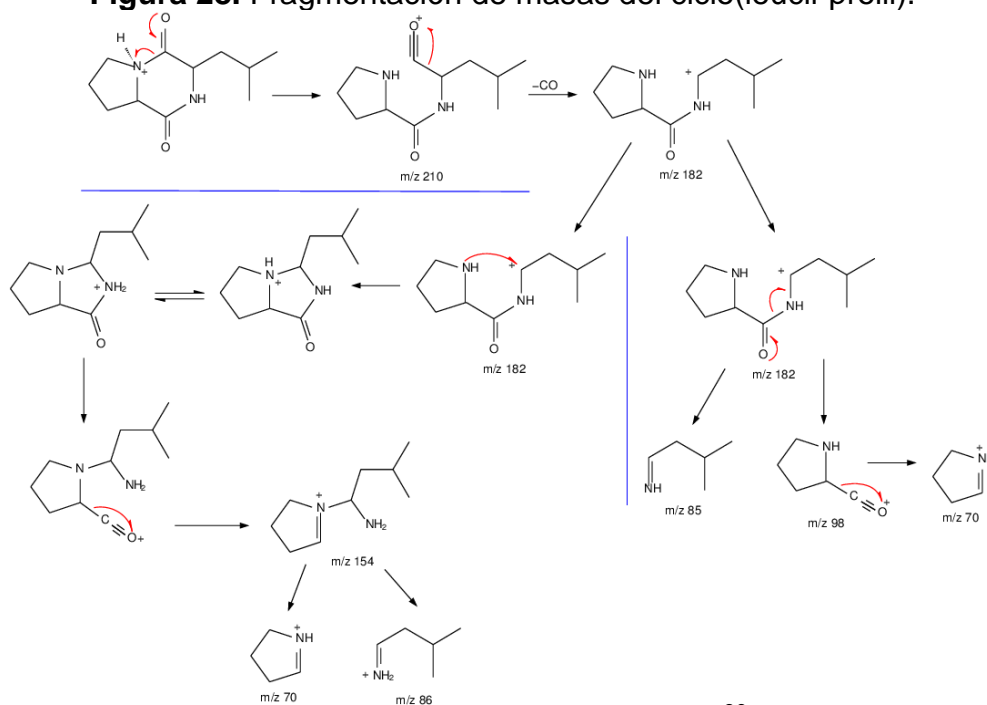
Otro alcaloide mayoritario es el 3-(2-metilpropil)-pirrolo[1,2a]-pirazina ó Ciclo(leucil-prolil). Este alcaloide es un derivado de las 2,5-diketopiperazinas, caracterizado por presentar fragmentaciones a m/z 41, 70 y 154, tal como lo indica su espectro de masas (figura 27). Sus fragmentaciones más comunes en el modo EI a 70 eV se pueden observar mediante la figura 28.

Figura 27. Espectro de masas del Ciclo(leucil-prolil).



Fuente: Esta investigación.

Figura 28. Fragmentación de masas del ciclo(leucil-prolil).



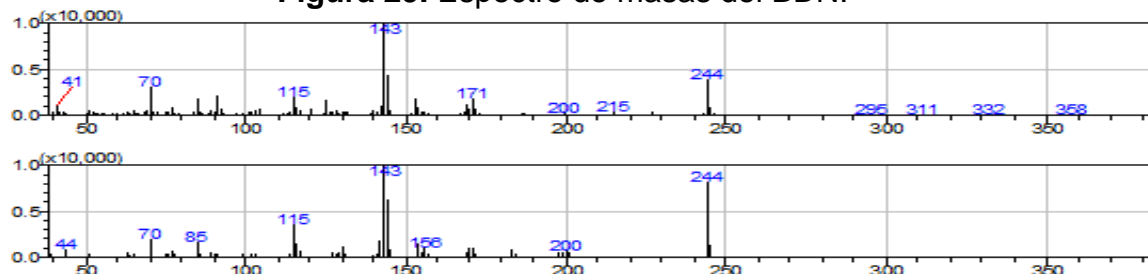
Fuente: Furtado, N. *et al.* (2007).⁹⁰

Sciences. *En: Chemical Communications* (1975). vol. 140. p. 1731-1734.

⁹⁰ Furtado N., Vessecchi R., Tomaz J., Galembeck S., Bastos J., Lopez N., Crotti A. Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem

El alcaloide 3-bencil-1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo-nonano (BDN) es de tipo indólico, algunas de sus fragmentaciones son similares a las propuestas por la figura 28 tal como la fragmentación a m/z 70, 85 y 154 comunes en alcaloides tipo indol. Su espectro se presenta en la figura 29.

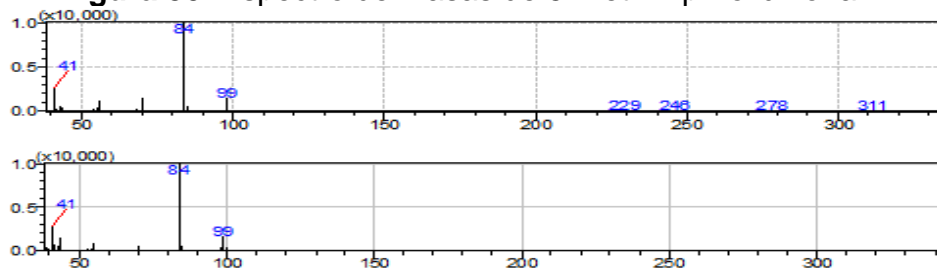
Figura 29. Espectro de masas del BDN.



Fuente: Esta investigación.

El alcaloide derivado de la pirrolidinona presente en el extracto presentan fragmentaciones en el modo EI a m/z 99, 84 y 41, el espectro de masas se indica en la figura 30.

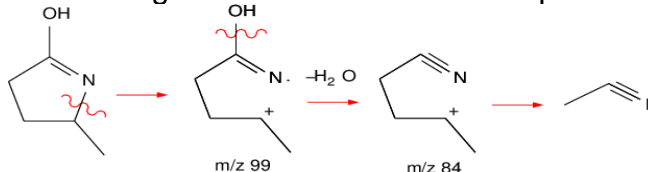
Figura 30. Espectro de masas de 5-metil-2-pirrolidinona.



Fuente: Esta investigación.

Para la fragmentación, la molécula se tautomeriza a su forma enol para poder hacer un rompimiento del enlace C5-N, posteriormente se libera el grupo - OH tal como lo indica Blossey (1964), en la fragmentación de la figura 31.

Figura 31. Fragmentaciones de 5-metil-2-pirrolidinona.



Fuente: Blossey, E. *et al.* (1964).⁹¹

⁹¹ mass spectrometry (ESI-MS/MS). *En: Journal of Mass Spectrometry* (2007). vol. 42, p. 1279-1286.

Blossey E., Budzikiewicz H., Ohashi M., Fodor G., Djerassi C. *Mass spectrometry in*

De la misma manera se analizaron los extractos derivatizados con el fin de determinar los alcaloides no volátiles que estén presentes en la yerbamora, los alcaloides comunes identificados para las dos variedades se presentan en la tabla 21, dichos alcaloides se presentaron como TMS-derivados.

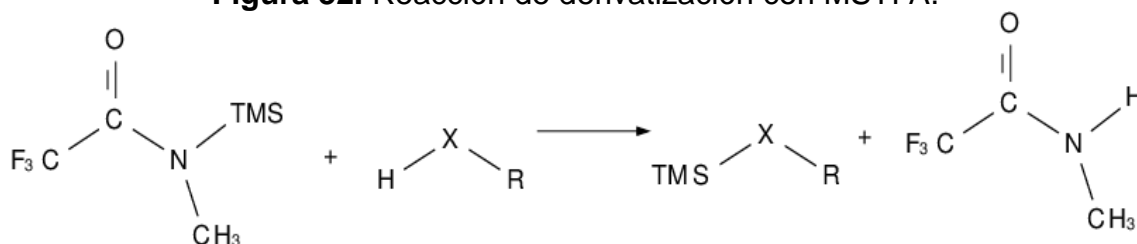
Tabla 21. Alcaloides no volátiles mayoritarios identificados en las hojas de yerbamora por GC-MS.

N°	Compuesto	t _R (min)	Masa molecular (m/z)	Fragmentos (m/z)
1	1-metil-2-feniletilamina	4,400	134	73, 100, 188
2	3,6-dihidro-3,6-dimetil-pirazina	5,100	110	73, 170
3	1H-Indol-3-acetamida	5,690	174	73, 202
4	Triptamina	7,655	160	73, 102, 203
6	5-metoxi--Indol-3-etanolamina	11,935	190	73, 231
7	Tiramina	12,075	137	73, 174
8	Feniletanolamina	13,480	137	73, 174

Fuente: Esta investigación.

Como estos alcaloides no son volátiles fue necesario realizar la derivatización del extracto empleando como agente derivatizante MSTFA, este reactivo se caracteriza por ser el más volátil del grupo de las TMS-acetamidas. La reacción de derivatización empleando MSTFA permite la sustitución de un hidrógeno del compuesto no volátil por el grupo TMS, esto aumenta la volatilidad de los alcaloides lo cual facilita su análisis por GC-MS. La reacción general entre el reactivo MSTFA y un compuesto no volátil se expresa en la figura 32.

Figura 32. Reacción de derivatización con MSTFA.



X = O, NH, NR, COO-

R = Alk, Ar

Fuente: HICHRM GC-Derivatization reagents.⁹²

structural and stereochemical problems. Tropane alkaloids. En: Tetrahedron (1964). vol. 20, p. 585-595.

⁹²

HICHRM GC-Derivatization reagents. Recuperado de:

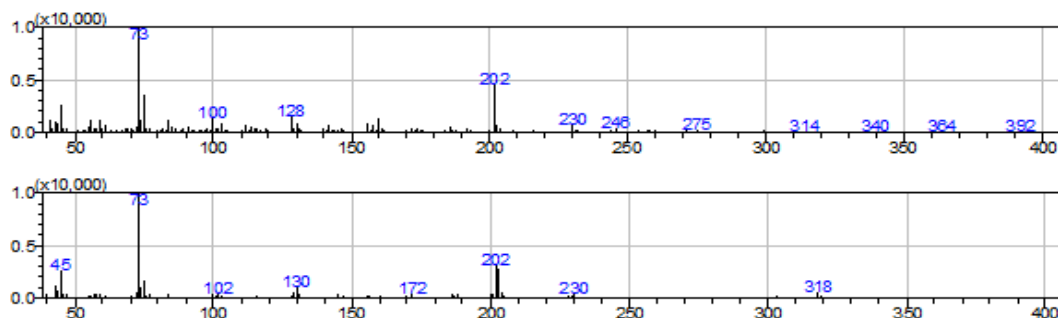
Los espectros de masas de dos derivados TMS tipo indólicos se registran en las figuras 33 y 34:

Figura 33. Espectro de masas de la triptamina.



Fuente: Esta investigación.

Figura 34. Espectro de masas de 1H-Indol-3-acetamida.



Fuente: Esta investigación.

4.5. Análisis de alcaloides de la yerbamora por HPLC-PDA

El análisis por HPLC-PDA se realizó con el propósito de ampliar la información analítica de los resultados obtenidos por GC-MS. Esta herramienta nos permite identificar la presencia de grupos alcaloidales en las hojas de yerbamora mediante el uso de los espectros UV-Vis. Se identificaron los principales grupos funcionales de los alcaloides mediante la comparación de los espectros UV-Vis obtenidos en el análisis con los espectros reportados en la literatura.

Los cromatogramas HPLC del extracto de hojas de yerbamora de las regiones de Chachagüi y Obonuco registran 22 picos comunes en total. Los compuestos mayoritarios en los extractos de ambas regiones, teniendo como criterio el promedio del tiempo de retención y absorbancia máxima (fase móvil ácido fórmico:agua), fueron 9 alcaloides para una longitud de onda $\lambda = 208$ nm; 4 alcaloides para $\lambda = 254$ nm y 9 alcaloides para $\lambda = 294$.

La clasificación del tipo de alcaloide y los valores de absorbancias máximas se consignan en la tabla 22, en donde se reportan los alcaloides como grupos funcionales; sin embargo no se reporta la identidad del alcaloide debido a que no se usaron estándares para identificarlos por HPLC debido a la cantidad de compuestos encontrados (picos cromatográficos) y su diferente naturaleza química.

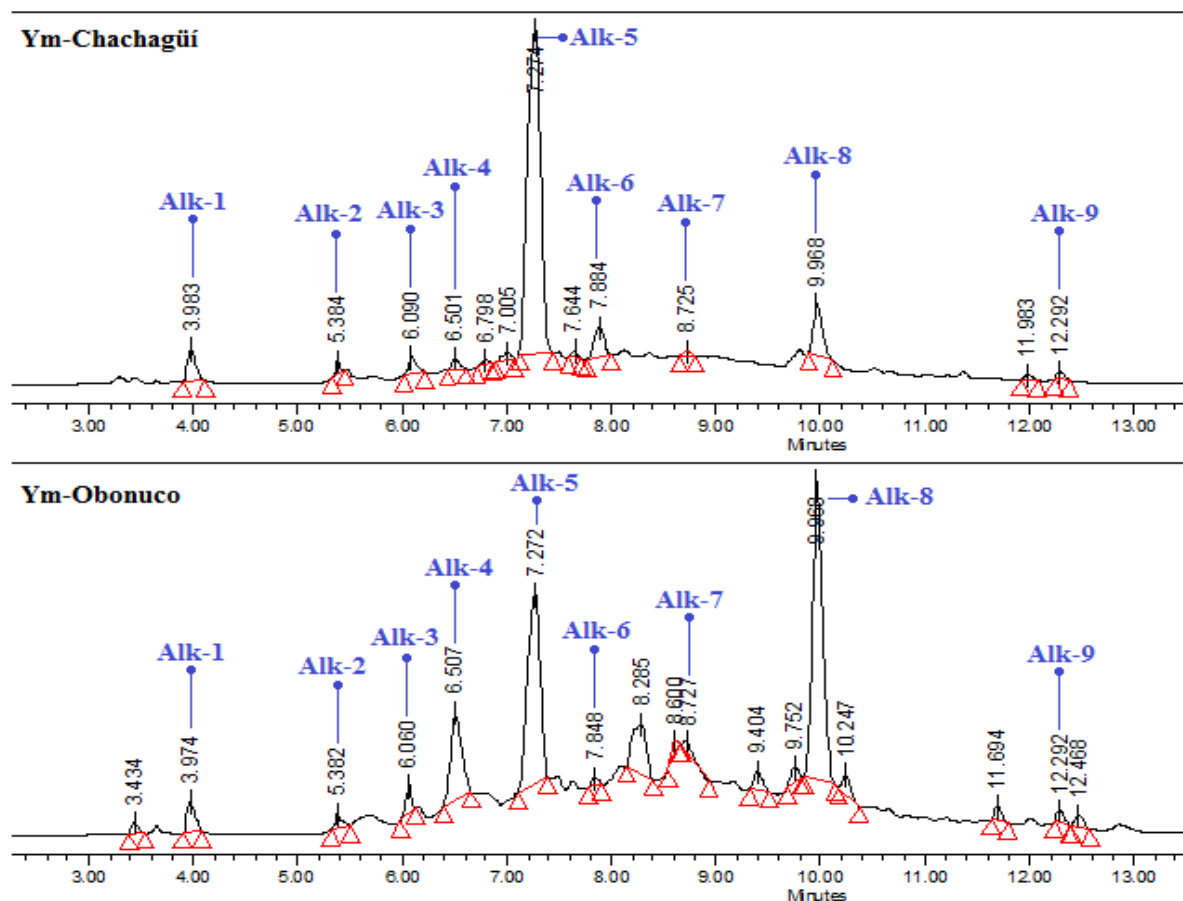
Tabla 22. Grupos de alcaloides identificados en las hojas de yerbamora originaria de Obonuco y Chachagüí por HPLC-PDA.

λ (nm)	Alcaloide	t_R (min)	Tipo	$\lambda_{max}^{HCOOH/H_2O}$ nm
208	Alcaloide 1	3,978	Esteroidal	208-266
	Alcaloide 2	5,383	Esteroidal	210
	Alcaloide 3	6,075	Indólico (ergot)	223-274
	Alcaloide 4	6,507	Isoquinolina	210-283
	Alcaloide 5	7,273	Dihidroindólico	224-260
	Alcaloide 6	7,866	Piridina	224-256-286
	Alcaloide 7	8,726	Esteroidal	210-279
	Alcaloide 8	9,968	Quinolona	230-280
	Alcaloide 9	12,292	Isoquinolina	273-363
254	Alcaloide 10	6,157	2-Quinolona	223-274
	Alcaloide 11	7,006	Quinolona	213-266
	Alcaloide 12	7,292	Isoquinolina	214-273
	Alcaloide 13	7,552	4-Quinolona	221-279
294	Alcaloide 14	5,686	Indólico	216-258-292
	Alcaloide 15	6,471	Isoquinolina	205-283
	Alcaloide 16	6,890	Indólico	223-260-294
	Alcaloide 17	7,288	Isoquinolina	214-273
	Alcaloide 18	8,040	Indólico	216-242-325
	Alcaloide 19	8,518	Indólico	215-323
	Alcaloide 20	9,959	Quinolona	232-280
	Alcaloide 21	10,655	Indólico	217-242-323
	Alcaloide 22	11,532	Quinolona	204-323

Fuente: Esta investigación.

Los espectros UV-Vis de algunos alcaloides junto con el cromatograma a una longitud de onda de 208 nm se aprecian en las figuras 35 a la 54. Los demás cromatogramas se adjuntan en el anexo F.

Figura 35. Cromatograma HPLC-PDA a $\lambda = 208$ nm.

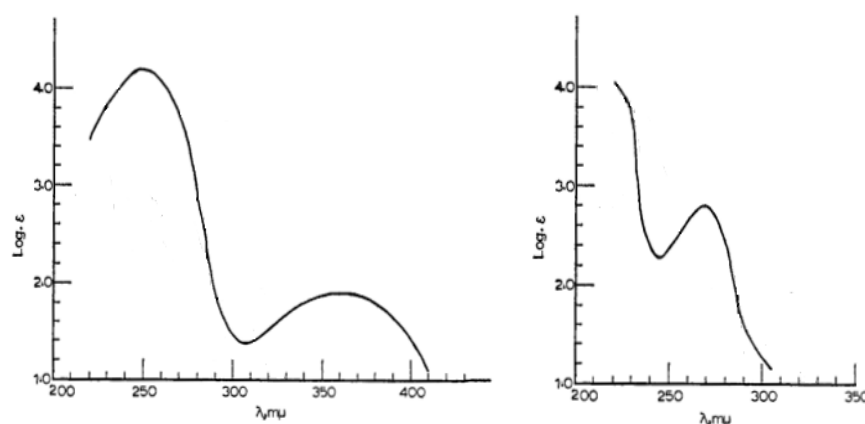


Fuente: Esta investigación.

La mayoría de alcaloides esteroidales presentan solo una insaturación entre los carbonos C5 y C6, la cual se manifiesta en una banda de absorción a 350 nm, esta banda también es común en alcaloides tropánicos; sin embargo los alcaloides esteroidales suelen presentar una banda de absorción intensa entre 230 a 254 nm característica de las aminas.⁹³ Los alcaloides 1, 2 y 7 presentan un espectro de absorción similar al reportado por Sangster A. *et al.* (1965) (figura 36).

⁹³ Sangster A., Stuart K. Ultraviolet spectra of alkaloids. University of the West Indies, Kingston. *En*: Chemical reviews (1965). vol. 65, p. 69-130.

Figura 36. Espectros UV-Vis de los alcaloides esteroidales y su desplazamiento batocrómico.

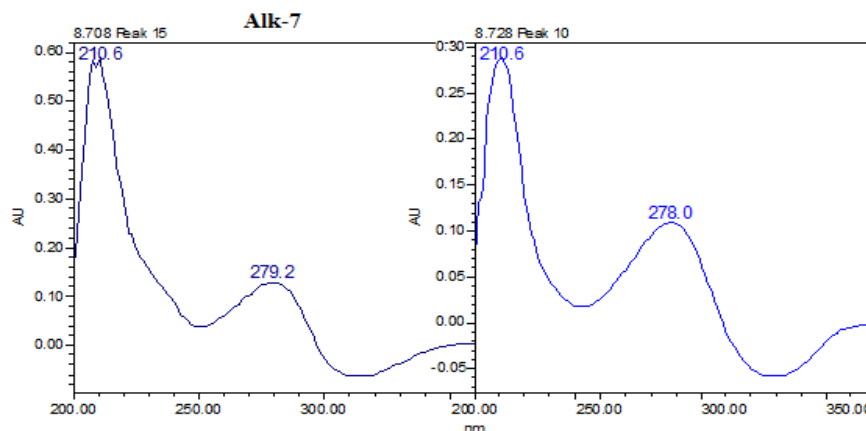


Fuente: Sangster A. *et al.* (1965).⁹⁴

El espectro UV-Vis presentado corresponde al alcaloide 7 (figura 37), hay que notar la similitud entre los espectros de alcaloides de yerbamora procedente de Obonuco (derecha) con Chachagüí (izquierda), además que sus tiempos de retención son similares (8,708 y 8,728 respectivamente), esto indica que se trata del mismo compuesto que está presente en las hojas de yerbamora en ambas regiones.

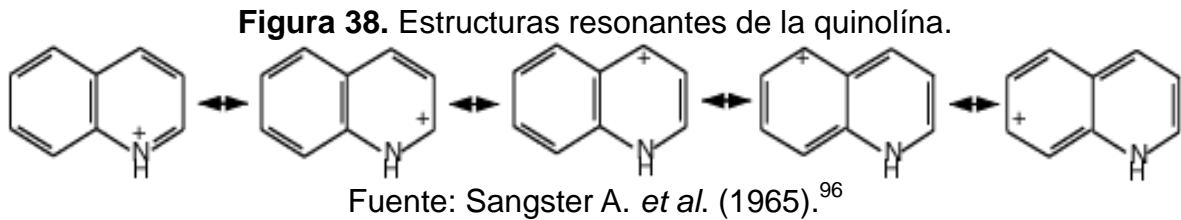
Los alcaloides 1 y 2 a pesar de presentar un espectro similar al alcaloide 7, presentaban diferentes tiempos de retención lo cual indica que se tratan de diferentes compuestos de la misma familia o pueden ser isómeros.

Figura 37. Espectro UV-Vis ($\lambda = 208$ nm) del alcaloide 7.



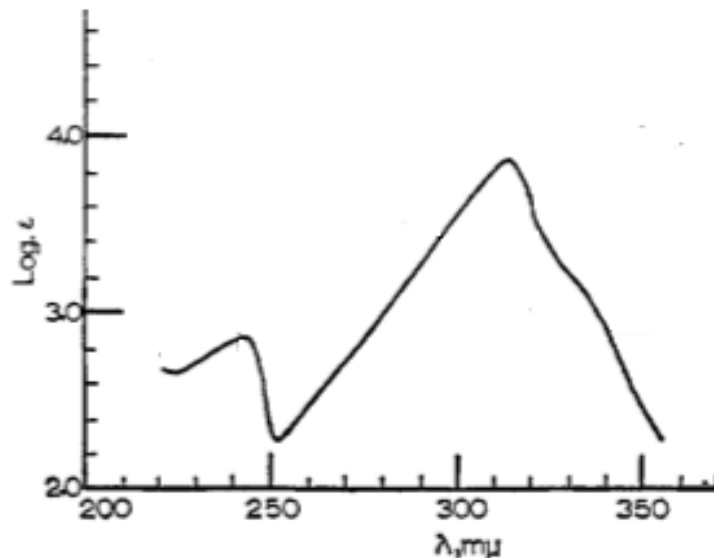
Fuente: Esta investigación.

Los alcaloides de la familia de las quinolinas presentan dos regiones de absorción a 240 y 310 nm respectivamente, esto debido a las estructuras resonantes de la quinolina protonada en solventes polar (figura 38).⁹⁵



Estas bandas mencionadas anteriormente para quinolinas, se pueden apreciar en la figura 39.

Figura 39. Espectro UV-Vis de las quinolinas.



Fuente: Sangster A. *et al.* (1965).⁹⁷

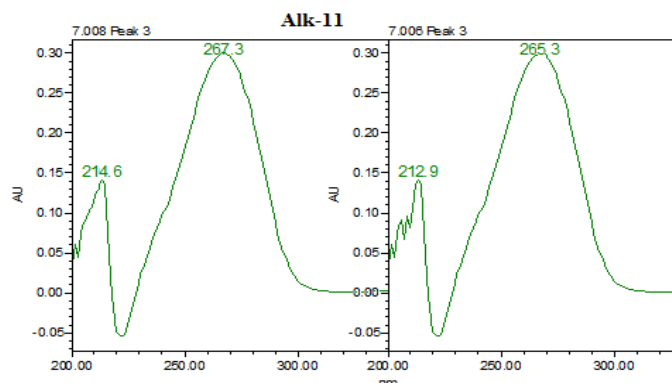
Los alcaloides 8, 11, 20 y 22 presentan espectros UV-Vis similares al espectro de la quinolina. La figura 40 presenta los espectros del alcaloide 11 para las regiones de Obonuco (derecha) y Chachagüí (izquierda).

⁹⁵ *Ibid.* p. 97.

⁹⁶ *Ibid.* p. 97-99.

⁹⁷ *Ibid.* p. 100-101.

Figura 40. Espectro UV-Vis ($\lambda = 254$ nm) del alcaloide 11.

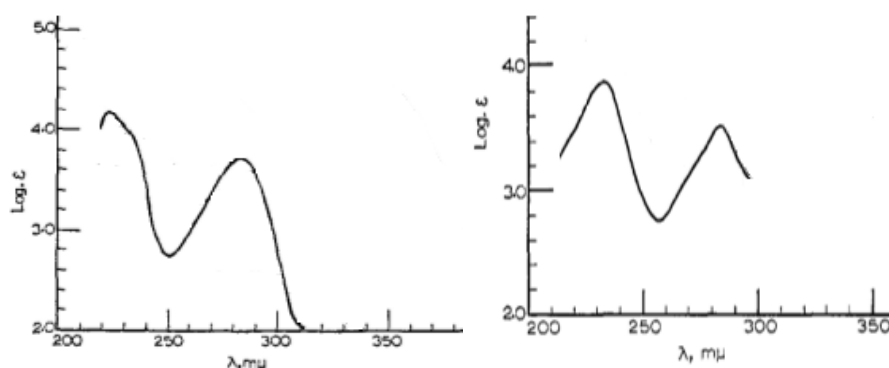


Fuente: Esta investigación.

En general, los alcaloides derivados de la isoquinolina presentan bandas de absorción aprox. a 235 nm a causa de su cromóforo benzopiridina; si su comóforo es la tetrahydroisoquinolina, la banda de absorción es menos intensa y se desplaza batocrómicamente. Si la molécula presenta un grupo auxógeno con oxígeno (-OH, -OR) que esté en conjugación con el benceno, el espectro de absorción es más complejo que la isoquinolina, presentando bandas entre los 300 a 350 nm según el grupo radical.

Los alcaloides opiáceos presentan bandas similares pero a menor intensidad, es decir, presentan un efecto hipocrómico, esto es causa de la presencia de un anillo no conjugado en su estructura.⁹⁸ Dichos espectros se presentan en la figura 41.

Figura 41. Espectro UV-Vis de las isoquinolinas (protopinas izquierda y erisodinas derecha).



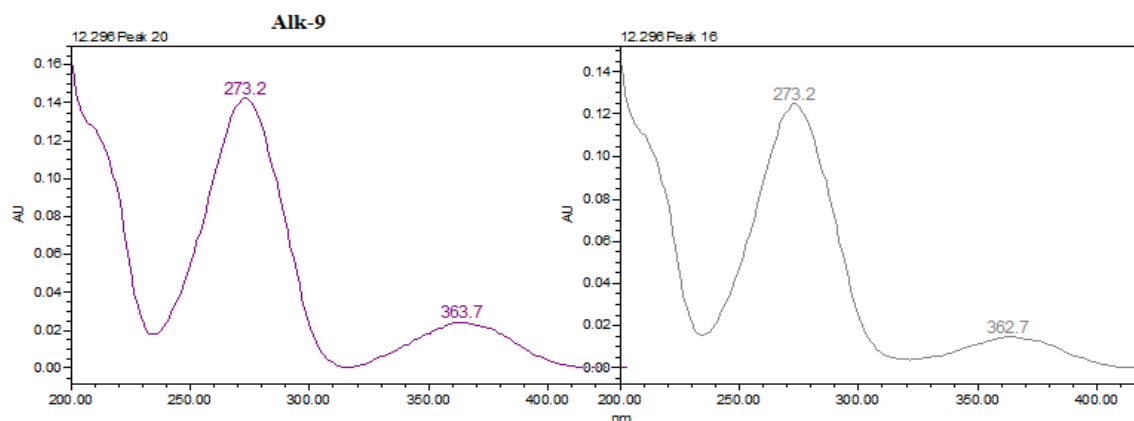
Fuente: Sangster A. *et al.* (1965).⁹⁹

⁹⁸ *Ibid.* p. 81-92.

⁹⁹ *Ibid.* p. 92.

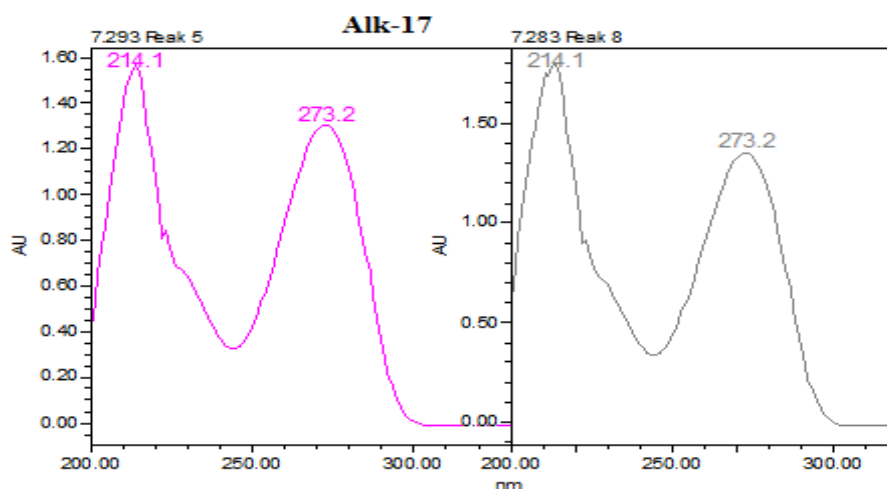
Los alcaloides 4, 9 y 17 presentan estas bandas características (figuras 42 y 43)

Figura 42. Espectro UV-Vis ($\lambda = 208$ nm) del alcaloide 9.



Fuente: Esta investigación.

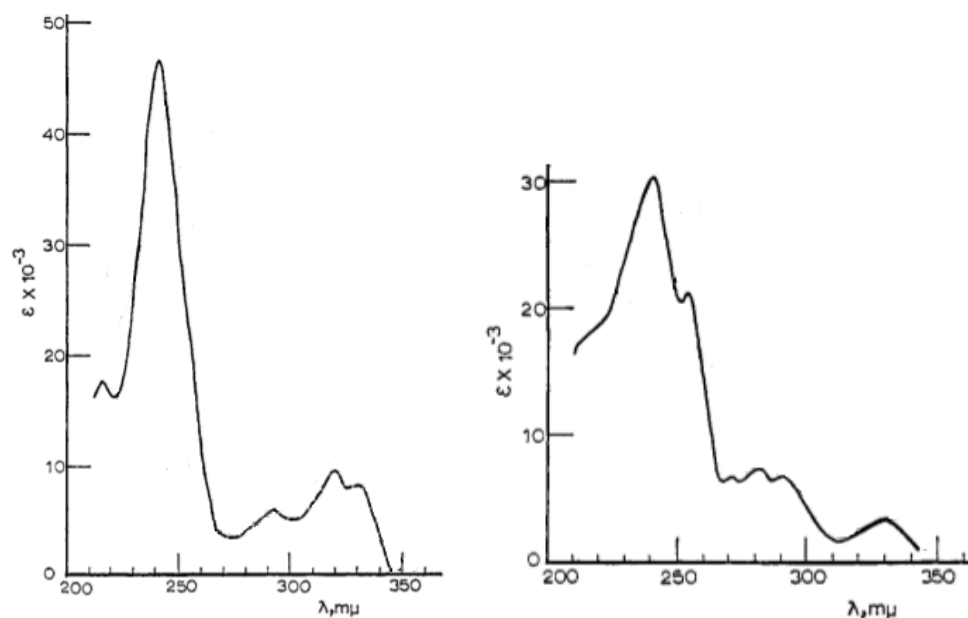
Figura 43. Espectro UV-Vis ($\lambda = 294$ nm) del alcaloide 17.



Fuente: Esta investigación.

Las quinolonas también presentan tres bandas de absorción a 235, 270 y 320 nm respectivamente, las cuales presentan un orden decreciente en intensidad. La diferencia principal entre 2-quinolonas y 4-quinolonas radica en la presencia de dos máximos de absorción en la banda de 270 nm en las 2-quinolonas mientras que en las 4-quinolonas es una sola banda; mientras que en la banda de 320 nm los derivados de 4-quinolonas presentan dos o tres máximos de absorción según los grupos auxóchromos, tal como lo indica la figura 44.¹⁰⁰

Figura 44. Espectro UV-Vis de las 2-quinolonas (derecha) y 4-quinolonas (izquierda).



Fuente: Sangster A. *et al.* (1965).¹⁰¹

A 254 nm se encontraron dos espectros similares a las 2 y 4-quinolonas, se denominaron estos compuestos como alcaloides 10 y 13, tal como lo indican las figuras 45 y 46 respectivamente.

Figura 45. Espectro UV-Vis, alk 10.

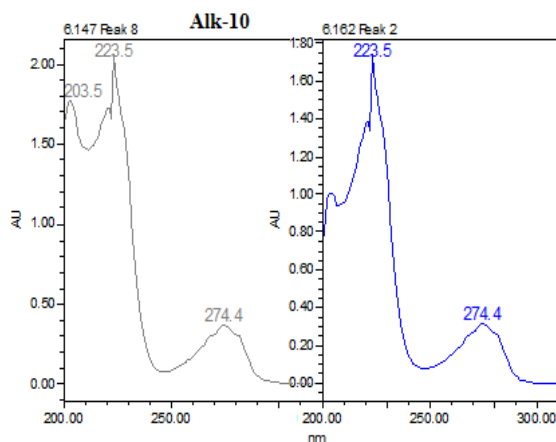
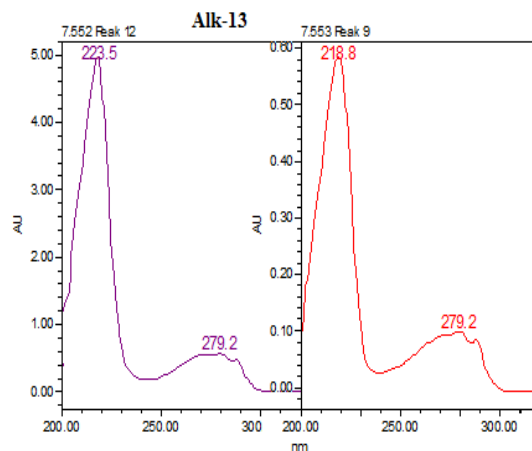


Figura 46. Espectro UV-Vis alk13.



Fuente: Esta investigación.

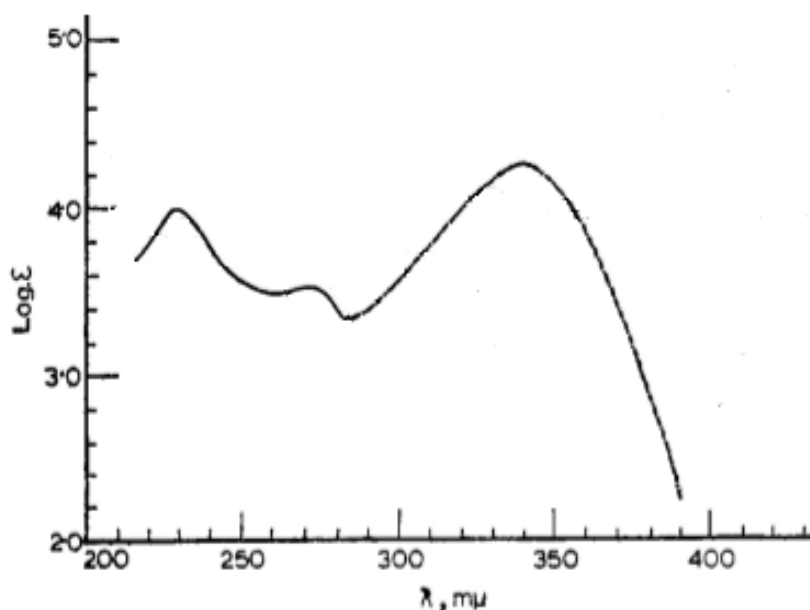
Respecto a los alcaloides indólicos, resulta difícil establecer un patrón general en sus bandas de absorción, esto se debe a la gran cantidad de alcaloides que presenta esta familia, tal como los ergot, los hidroxialquil indoles, oxindoles, vinilindoles, indolinas, entre otros.

Generalmente los indoles presentan dos tipos de bandas a 245 y 295 nm las cuales pueden sufrir desplazamientos batocrómicos o hipsocrómicos según el sustituyente y el solvente. Grupos auxóchromos que contienen el grupo hidroxilo presentan bandas muy intensas a 330 nm mientras que los cetoésteres α,β -insaturados presentan un desplazamiento batocrómico.¹⁰²

A continuación se presentan los espectros UV-Vis de diferentes tipos de alcaloides indólicos y su comparación con los espectros obtenidos por HPLC-PDA.

Los alcaloides indolo-quinolinas N, 2, 3 trisustituídos presentan una banda de absorción a 230 nm aproximadamente, con un máximo de absorción a 250 nm y una banda intensa entre los 330 nm. Un ejemplo de esta clase de alcaloides se observa en la figura 47 y su espectro similar es el alcaloide 19 (figura 48)

Figura 47. Espectro UV-Vis de los indoles N, 2, 3 sustituidos.

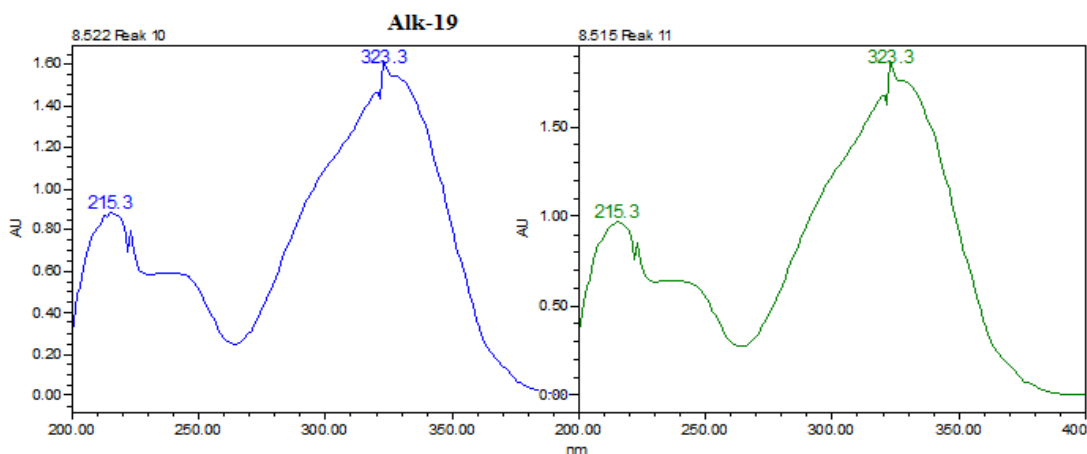


Fuente: Sangster A. *et al.* (1965).¹⁰³

¹⁰² *Ibid.* p. 84-90.

¹⁰³ *Ibid.* p. 106.

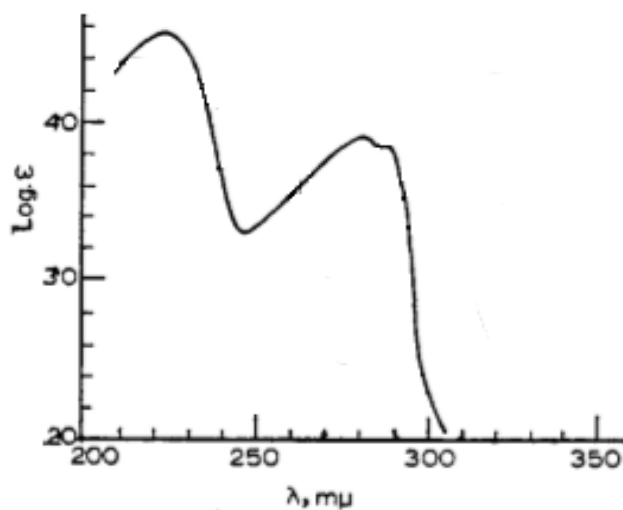
Figura 48. Espectro UV-Vis ($\lambda = 294$ nm) del alcaloide 19.



Fuente: Esta investigación.

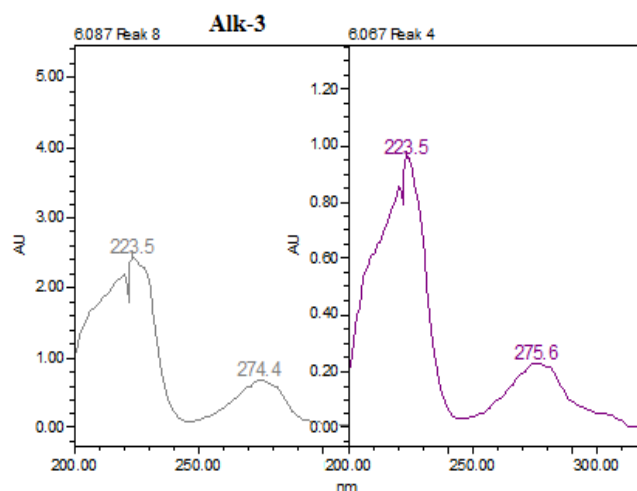
Los alcaloides de la familia ergot (ergotamina, ergocriptina, entre otros) presenta una estructura base de tipo indolo-quinolina 3, 4 disustituídas la cual presenta dos bandas entre 210 a 240 nm y 260 a 290 nm. Su espectro es similar a las quinolinas con la diferencia que la banda de mayor energía (menor λ) en alcaloides tipo ergot es menos intensa que las quinolinas, esto hace que la diferencia de intensidades entre las dos bandas no sea tan notoria. La figura 49 presenta un espectro típico de indolo-quinolinas mientras que la figura 50 presenta el espectro obtenido por HPLC-PDA.

Figura 49. Espectro UV-Vis de los indoles (ergotamina).



Fuente: Sangster A. *et al.* (1965).¹⁰⁴

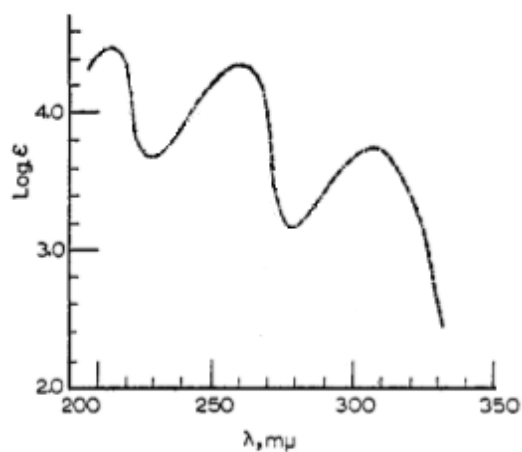
Figura 50. Espectro UV-Vis ($\lambda = 208$ nm) del alcaloide 3.



Fuente: Esta investigación.

Los oxoindoles son compuestos que presentan el grupo carbonilo en la posición 2 de la estructura bicíclica del indol, esta clase de alcaloides son derivados del triptófano, su cromóforo indol genera transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ manifestada en dos bandas intensas en regiones de mayor energía (λ aproximada entre 210 y 250 nm); su auxócromo carbonilo genera una banda menos intensa a 300 nm. La figura 51 es un ejemplo del espectro de alcaloides oxoindólicos (indoles monoterpénicos) y la figura 52 es el espectro obtenido por análisis de HPLC-PDA.¹⁰⁵

Figura 51. Espectro UV-Vis de los indoles monoterpénicos.



Fuente: Sangster A. *et al.* (1965).¹⁰⁶

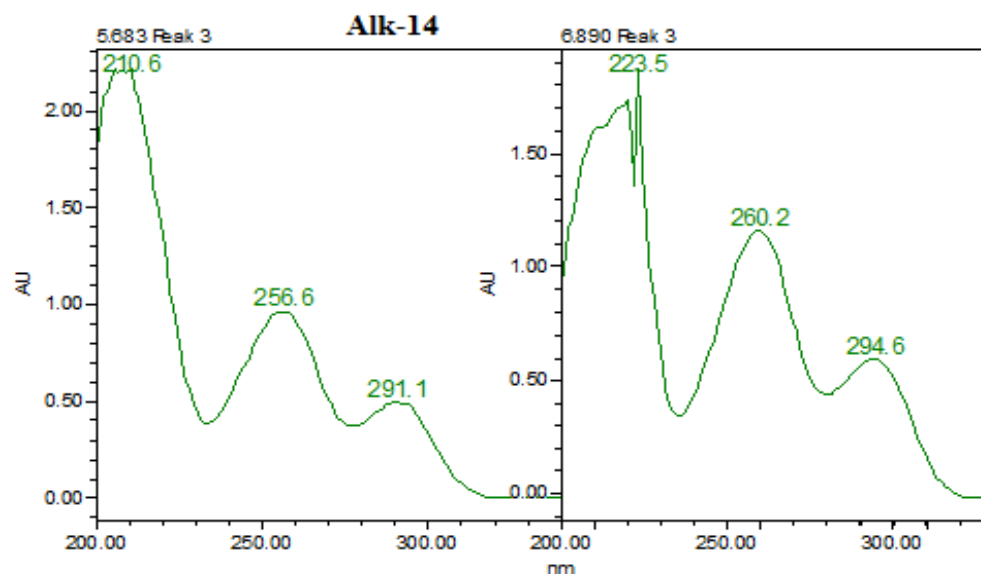
¹⁰⁵

Ibid. p. 84.

¹⁰⁶

Ibid. p. 105.

Figura 52. Espectro UV-Vis ($\lambda = 294 \text{ nm}$) del alcaloide

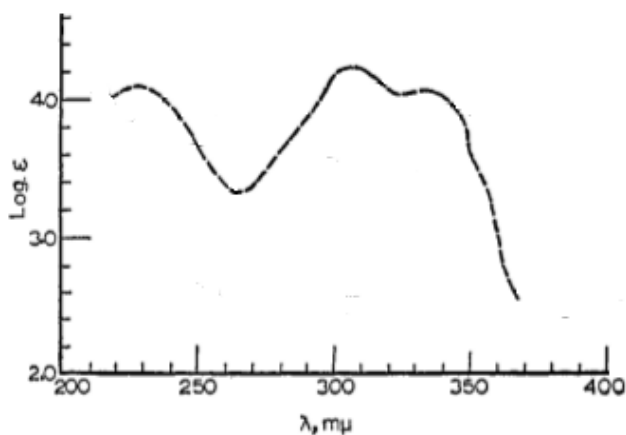


14.

Fuente: Esta investigación.

Los 2-vinil-indoles presentan una banda intensa entre los 210 a 230 nm; entre los 300 a 350 nm presentan una banda intensa y un hombro característico del grupo vinilo; sin embargo esta banda presenta un desplazamiento hipsocrómico respecto a un alqueno normal.¹⁰⁷ Las figuras 53 y 54 indican el espectro UV-Vis en general de vinil-indoles y uno de los espectros obtenidos en el desarrollo de la investigación respectivamente.

Figura 53. Espectro UV-Vis de los alcaloides dihidroindólicos.



Fuente: Sangster A. *et al.* (1965).¹⁰⁸

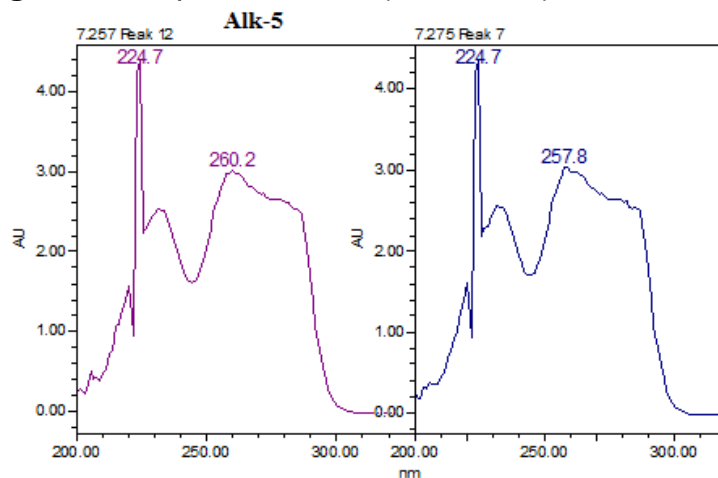
¹⁰⁷

Ibid. p. 105-106.

¹⁰⁸

Ibid. p. 106.

Figura 54. Espectro UV-Vis ($\lambda = 208$ nm) del alcaloide 5.



Fuente: Esta investigación.

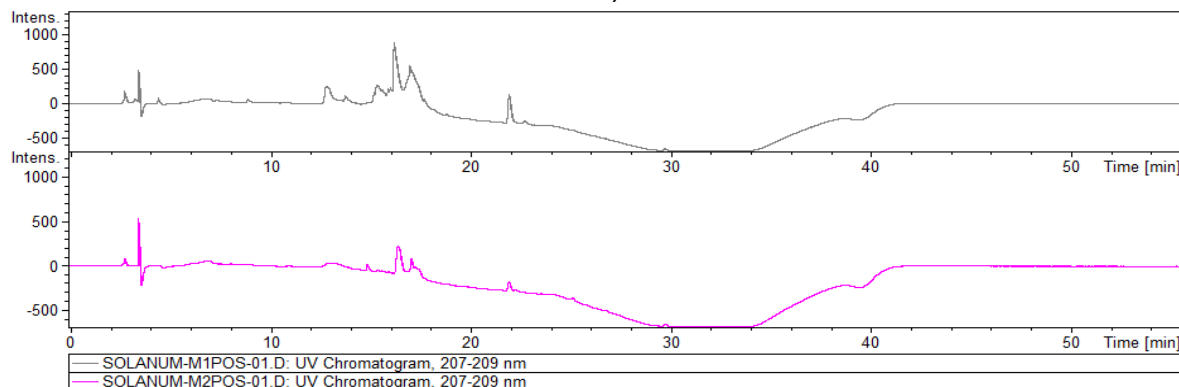
La protonación de las aminas genera un efecto hipsocrómico, como el solvente usado fue ácido fórmico acuoso los datos espectrales se presentaron a menores longitudes de onda que los valores reportados en la literatura.¹⁰⁹

4.6. Análisis de alcaloides de la yerbamora por LC-MS/MS

El análisis por LC-MS/MS se realizó como complemento al análisis de los alcaloides presentes en las muestras.

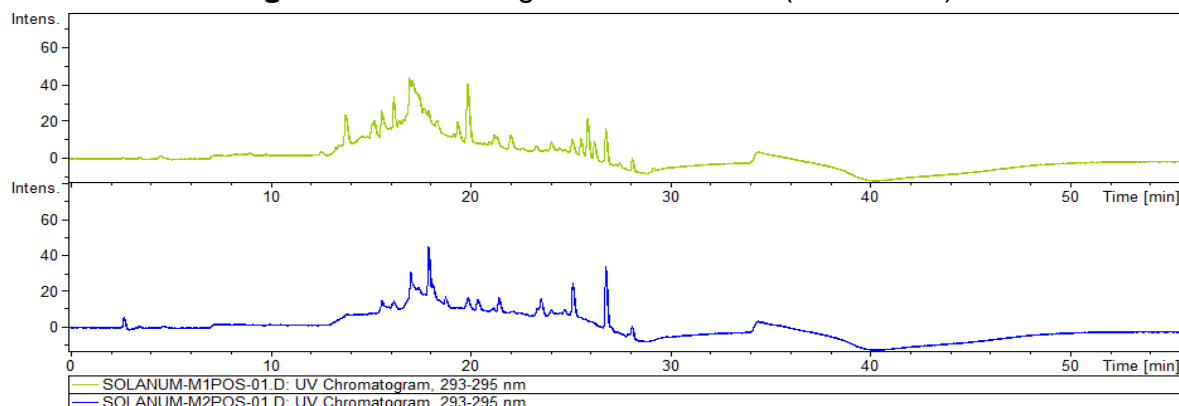
Los cromatogramas de las dos variedades de yerbamora analizados a 208 nm y 294 nm se presentan en las figuras 55 y 56.

Figura 55. Cromatograma LC-MS/MS ($\lambda = 208$ nm).



Fuente: Esta investigación.

Figura 56. Cromatograma LC-MS/MS ($\lambda = 294$ nm).



Fuente: Esta investigación.

La identificación tentativa de los alcaloides se realizó por la comparación de los espectros de masas empleando la base de datos Mass Bank, los cuales se presentan en la tabla 23.

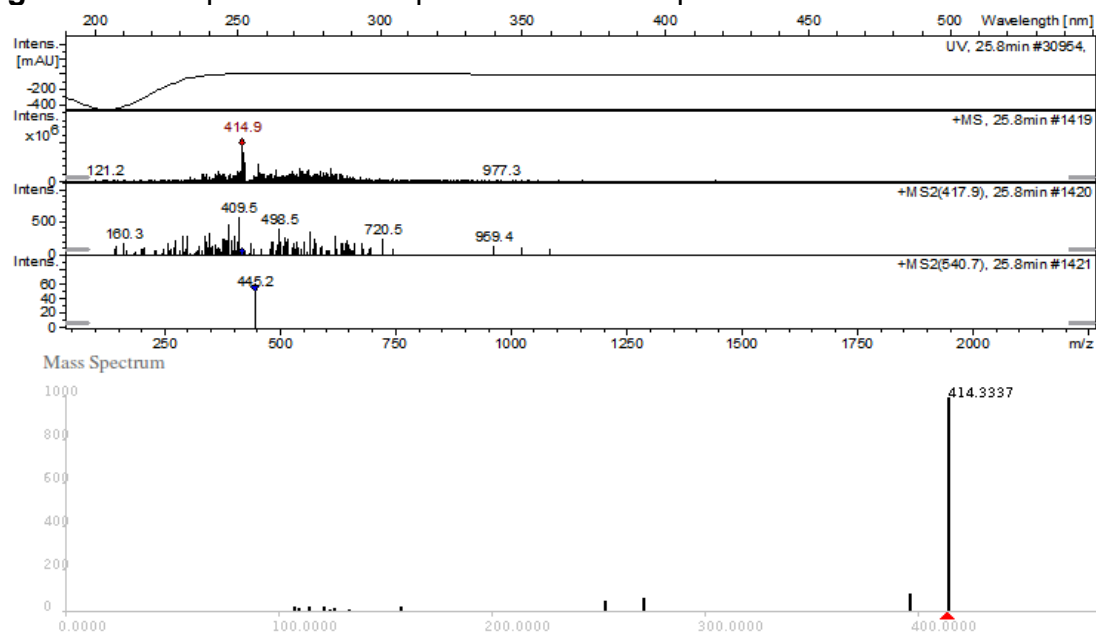
Tabla 23. Alcaloides mayoritarios identificados en las hojas de yerbamora por LC-MS/MS.

λ max	Alcaloide	t_R (min)	Masa molecular (m/z)	Fragmentos (m/z)
208 nm	Indolilmetil glucosinolato	2,8	448	449
	Feruloil-tiramina	4,6	313	314
	Brucina	13,9	393	394
	Ergocriptina	17,0	575	574
294 nm	Glucorucina	15,7	421	422
	Hipaconitina	16,1	615	616
	Ajmalicina	16,8	352	353
	Ergotamina	21,1	581	582
	Solasodina	25,8	413	414
	Cinchonina	26,8	294	295

Fuente: Esta investigación.

El espectro de masas y las fragmentaciones de la solasodina (espectro superior) con su respectiva comparación de la base de datos (espectro inferior) se presenta en la figura 57:

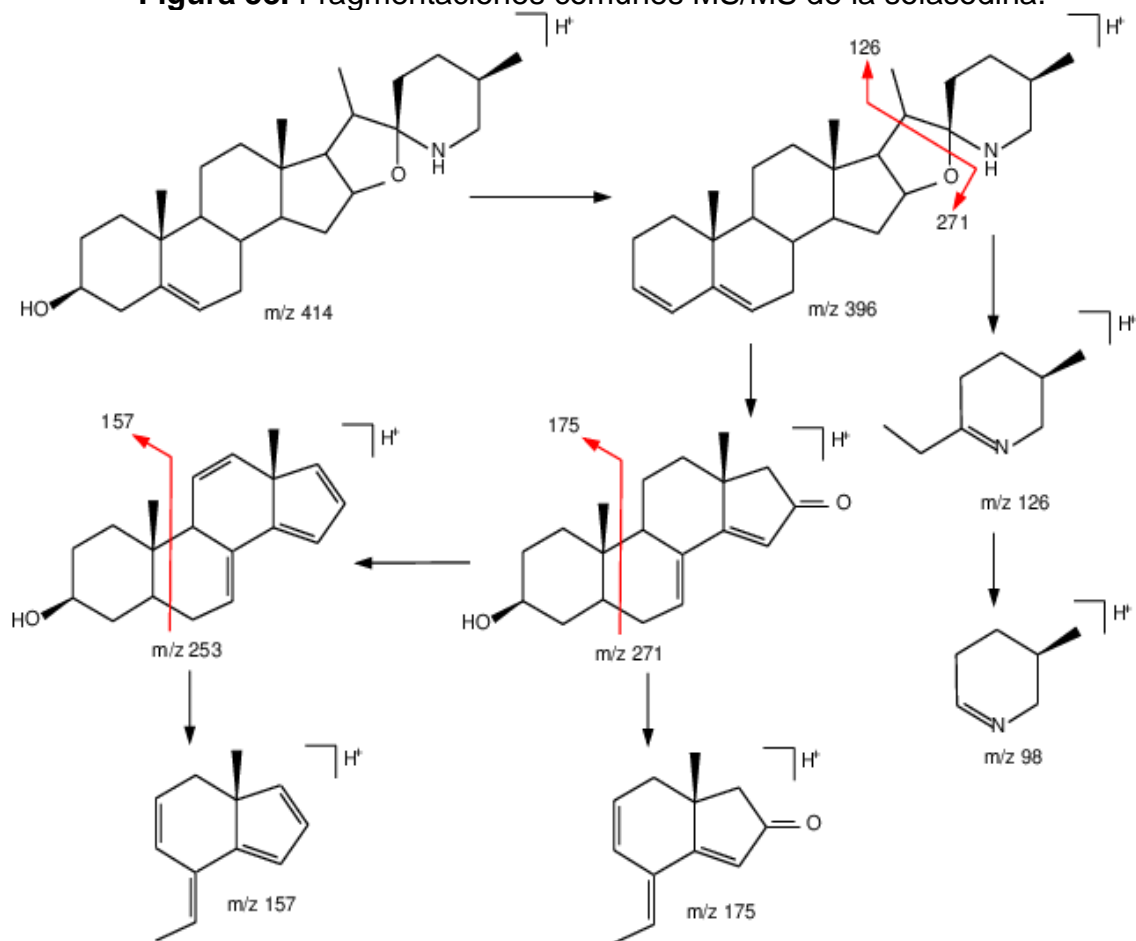
Figura 57. Comparación de espectros de masas por LC-MS/MS de la solasodina.



Fuente: Esta investigación.

Entre los alcaloides identificados por LC-MS/MS se encuentra la solasodina, este compuesto también es reportado en trabajos realizado por otros autores entre los cuales se encuentran Sammani A. *et al.* (2015), el cual reporta la presencia de solasodina en frutos y hojas de muestras recolectadas en Siria;¹¹⁰ Mohy-ud-din A. *et al.* (2010) reportaron solasodina en frutos en muestras procedentes de Pakistan;¹¹¹ mientras que Ding X. *et al.* (2013) reportan este alcaloide en muestras recolectadas en China.¹¹² La figura 58 presenta las fragmentaciones MS/MS de la solasodina.

Figura 58. Fragmentaciones comunes MS/MS de la solasodina.



ente: Cahill, M. *et al.* (2010).¹¹³

Fu

¹¹⁰ Sammani A., Shammaa E., Chehna F. Qualitative and quantitative Steroidal alkaloids of *solanum* species distributed widely in Siria by TLC and HPLC. *En: International journal of pharmaceutical sciences review and research* (2013). vol. 23, p. 23-27.

¹¹¹ Mohy-ud-din A., Khan M., Ahmad M., Kashmiri A. Chemotaxonomic value of alkaloids in *solanum nigrum* complex. *En: Pakistan Journal of Botany* (2010). vol. 42, p. 653-660.

¹¹² Ding X. *et al.* (2013). *op. cit.*, p. 1181-1186.

¹¹³ Cahill M., Caprioli G., Vittori S., James K. Elucidation of the mass fragmentation pathways

Otros alcaloides como la ajmalicina y la cinchonina ha sido reportados en otras especies del género *solanum* tal como *solanum khasianum*, según lo reporta Srivastava M. *et al.* (2016).¹¹⁴

La hipaconitina, en cambio, se reportó tentativamente en la especie *Solanum aethiopicum* por Kouassi K. *et al.* (2016).¹¹⁵

No hay referencias de ergotamina ni ergocriptina en la especie *solanum nigrum* en otros estudios, lo cual hace de la planta una especie promisoría en este tipo de compuestos, siendo de gran interés ya que pueden ser compuestos que se encuentren en las variedades nativas del departamento.

of potato glycoalkaloids and aglycons using Orbitrap mass spectrometry. En: Journal of mass spectrometry (2010). vol 45, p. 1019-1025.

¹¹⁴ Srivastava M., Sharma S., Misra P. Elicitation Based Enhancement of Secondary Metabolites in *Rauwolfia serpentina* and *Solanum khasianum* Hairy Root Cultures. En: Pharmacognosy magazine (2016). vol. 12, p. 315-320.

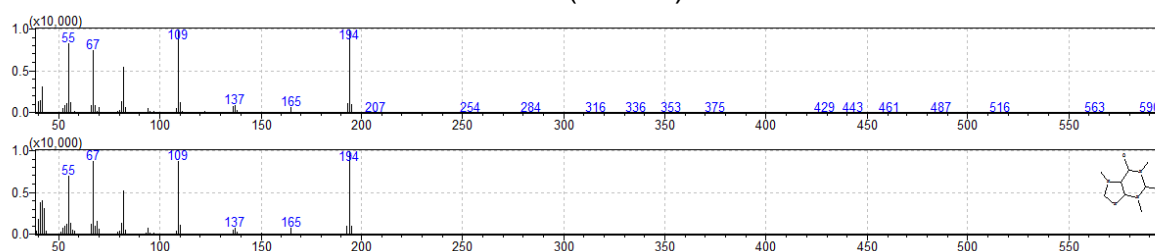
¹¹⁵ Kouassi K., Sorokina E., Mamybékova B., Békro Y. UV-Visible spectrophotometric detection of *Solanum aethiopicum* hexanic and n-butanolic excerpts and their anticancer activity monitored by flow cytometry and microscopy . En: Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research (2016). vol. 5, p. 28-39.

4.7. Límite de detección, exactitud y precisión de la metodología de alcaloides de la yerbamora por GC-MS

Para la cuantificación por el método del estándar interno por GC-MS de los alcaloides en la yerbamora de las dos zonas de recolección se empleó un estándar de cafeína de concentración 200 ppm. El estándar interno fue adicionado a las muestras antes de realizar la hidrólisis ácida de las hojas con el fin de determinar la exactitud del método expresado en el porcentaje de recuperación.

Los cromatogramas de los extractos indican que la cafeína no se degradó en el proceso de extracción (ver figura 23), así mismo el espectro de masas de la cafeína (figura 59), presentada a un tiempo de retención en promedio de 11,42 minutos; lo cual es un indicio de que el método de extracción no altera la naturaleza de los alcaloides presentes en las muestras.

Figura 59. Espectro de masas de la cafeína como estándar interno (superior) y teórico (inferior).



Fuente: Esta investigación.

Para la determinación de límite de detección se realizó una recta de calibración de cafeína a diferentes concentraciones (el proceso se realizó por triplicado) y se determinó el área de los picos cromatográficos con el fin de encontrar la relación concentración-área cromatográfica. Dichos valores se registran en la tabla 24.

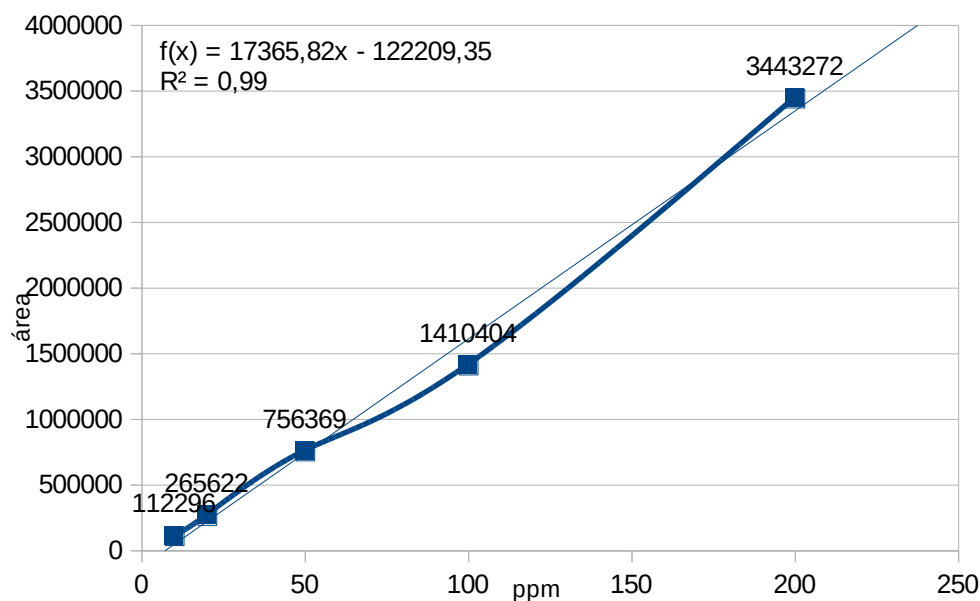
Tabla 24. Datos de la recta de calibrado del estándar interno para el límite de detección.

Cafeína (ppm)	t _R (min)	CV (%)	Área cromatográfica (promedio de cuentas $\mu\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)	CV (%)
10	11,281	0,20	112.296	3,5
20	11,267	0,21	265.622	7,3
50	11,289	0,25	756.369	13,1
100	11,270	0,42	1'410.404	2,6
200	11,255	0,57	3'443.272	5,1

Fuente: Esta investigación.

De esta manera se procedió a graficar el área cromatográfica en función de la concentración de cafeína en ppm tal como lo indica la gráfica 16.

Gráfica 16. Recta de calibración de la cafeína.



Fuente: Esta investigación.

Con los valores de la gráfica se determinó la tendencia lineal la cual se ciñe a la ecuación 5, en donde el área cromatografica es función de la concentración en partes por millón (C_{ppm}).

$$A(C_{ppm}) = 17.366 * C_{ppm} - 122.209 \quad \text{Ecuación 5}$$

Los límites de detección se calcularon teniendo en cuenta el promedio de área de la señal ruido de la línea base ($2921,6 \mu V.s^{-1}$) y el valor de su desviación estándar empleando la ecuación descrita por the internationa conference on harmonisation (ICH):¹¹⁶

$$L_D = \frac{3,3 * \sigma}{s} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde L_D es el límite de detección (en ppm), s es el valor de la pendiente de la recta de calibrado y σ es la desviación estándar. Realizando el cálculo se obtuvo que el valor del límite de detección corresponde a 0,25 ppm.

Para calcular el porcentaje de recuperación de la cafeína en los extractos

¹¹⁶ Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), International Committee on Harmonization (2005). p. 8-13.

inyectados, se tomó como referencia el valor del área cromatográfica en promedio de la cafeína adicionada a la yerbamora; este valor se reemplazó en la *ecuación 5* con el fin de determinar la concentración real de cafeína en la muestra y contrastar el valor teórico (200 ppm) con dicho valor. El promedio de los valores de áreas de la cafeína recuperada fue de 186 ppm, por lo tanto al relacionar el valor experimental con el teórico se tiene que el porcentaje de recuperación de la cafeína corresponde al 93%; este valor indica que la cafeína no sufrió reacciones en el proceso de hidrólisis y que el método de extracción de alcaloides es adecuado.

4.8. Cuantificación de alcaloides presentes en las hojas de yerbamora nativa de Obonuco y Chachagüí

La cuantificación de alcaloides se realizó mediante el uso de la *ecuación 7*. Para la obtención de los datos se empleó el software Labsolutions (Shimadzu corporations). La concentración en ppm de cada alcaloide se calculó multiplicando la concentración del estándar interno (200 ppm de cafeína) por la razón entre el área cromatográfica individual (A_{alk}) y la total (A_T), de la siguiente manera:

$$ppm_{alk} = 200ppm * \frac{A_{alk}}{A_T}$$

Ecuación 7

El área total es el resultado de la sumatoria de áreas de los alcaloides individuales identificados. El valor se expresa en miligramos de cada alcaloide sobre la masa de material vegetal tratado.

Para la comparación de las dos zonas de muestreo se elaboró un resumen del promedio de número de alcaloides y su concentración con el fin de contrastar los valores y determinar las diferencias significativas entre las variedades de yerbamora procedentes de Obonuco y Chachagüí, estos valores se presentan en la tabla 25:

Tabla 25. Cuantificación de alcaloides en las hojas de yerbamora por GC-MS.

Procedencia	Alcaloides totales (promedio)		Alcaloides similares (promedio)	
	Número	Concentración (mg/g)	Número	Concentración (mg/g)
Obonuco	25	0,904	16	0,441
Chachagüí	21	0,291		0,158

Fuente: Esta investigación.

Con los valores de la tabla 25 se procedió a realizar un ANOVA, para ello sólo se tuvo en cuenta la concentración de los alcaloides presentes en las hojas de las

dos variedades de yerbamora, estos datos se resumen en la tabla 26.

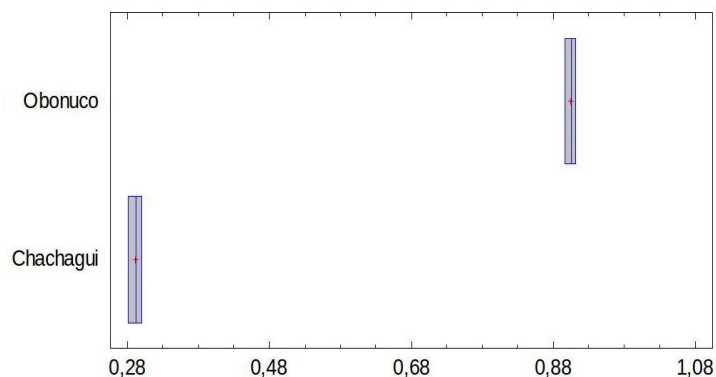
Tabla 26. Repetibilidad del método de extracción.

Variedad	Concentración (mg/g)			Promedio (mg/g)	% CV
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
Obonuco	0,911	0,897	0,906	0,904	1,09
Chachagüí	0,300	0,281	0,292	0,291	3,28

Fuente: Esta investigación.

Los valores del % CV indican que el método de extracción presentó valores inferiores al 5 % lo cual es aceptable para el análisis de compuestos mediante GC-MS. Por lo tanto el método de extracción presenta una buena repetibilidad.¹¹⁷

Gráfica 17. Caja y bigotes de la repetibilidad del método.



Fuente: Esta investigación.

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de alcaloides comunes en las hojas de variedades de yerbamora provenientes de Obonuco y Chachagüí. Esto se confirmó estadísticamente mediante el análisis de las dos medias de las muestras a un nivel de confianza del 95%. El gráfico 17 de caja y bigotes indica el contraste entre ambas variedades, así como la baja dispersión de los datos en las réplicas en las dos variedades.

Estos datos indican que la variedad de *solanum nigrum* L originaria del corregimiento de Obonuco presentó mayor número de alcaloides respecto a la variedad procedente del municipio de Chachagüí. Referente a los alcaloides similares en ambas variedades, la tabla 27 compara la concentración de alcaloides totales para las dos zonas de estudio.

¹¹⁷ Validation of chromatographic methods. Center for drug evaluation and research CDER (1994). p. 4-28.

Tabla 27. Concentración promedio de alcaloides mayoritarios identificados en las hojas de yerbamora por GC-MS.

N°	Compuesto	t _R min	Concentración (mg/g)	
			Chachagüí	Obonuco
1	5-Metil-2-pirrolidinona	4,676	0,039	0,107
2	4-heptanamina	6,300	0,008	0,011
3	3,3-dimetil-2-butanamina	7,020	0,014	0,024
4	5-nonilamina	7,730	0,007	0,010
5	2-pirrolidin-metanol	8,255	0,006	0,011
6	1-metil-2-hidroxi-2-fenil-N,N-dimetil-etilamina	9,280	0,003	0,006
7	2-(metoximetil)-pirrolidina	10,440	0,004	0,007
8	4-(pirrolidin-2-ilcarbonil)-morfolina	11,630	0,024	0,048
9	3-(2-metilpropil)-pirrolo[1,2]-pirazina	12,315	0,019	0,023
10	Ergocriptina	12,660	0,021	0,034
11	3,9-diazatriciclo-dodecan-2,8-diona	12,785	0,004	0,004
12	3-(dietilamino)-1,2-propanodiol	14,245	0,006	0,009
13	2-[3-hidroxipropil]-5-pirrolidinona	17,170	0,004	0,007
14	Ácido 4-Pirrolo benzazocina-carboxílico	20,060	0,014	0,047
15	3-bencil-1,4-diaza-2,5-dioxobiciclo-nonano	20,750	0,005	0,029
16	9-Octadecenamida	27,100	0,004	0,058
*n=3		Total	0,158	0,441

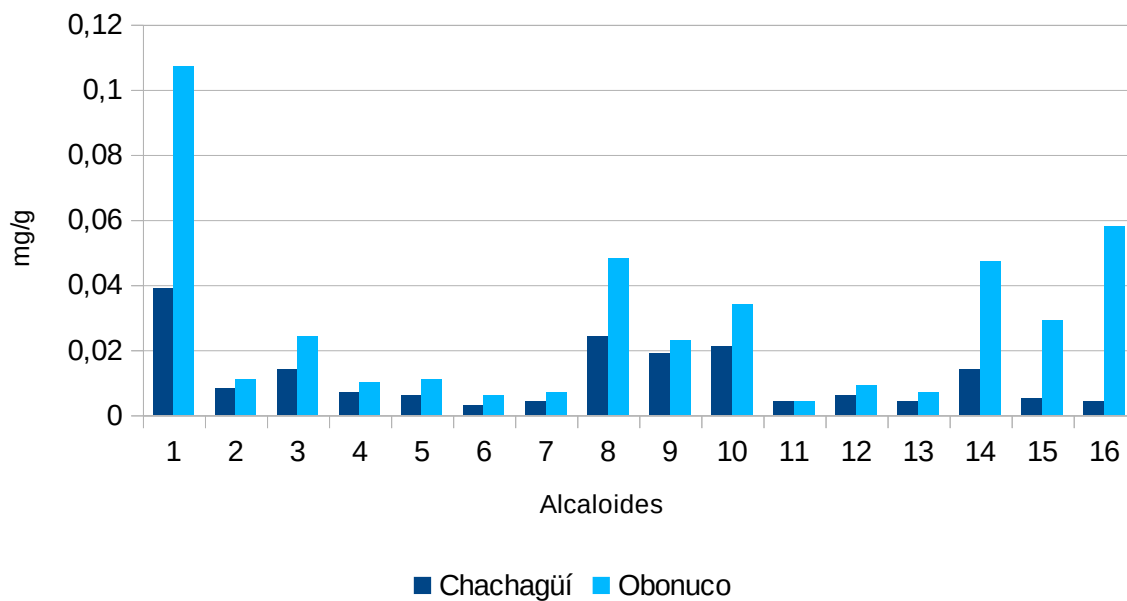
Fuente: Esta investigación.

Esto indica que la concentración de alcaloides es mayor en la variedad de Obonuco, esta afirmación resulta válida considerando las condiciones ambientales de las dos regiones: Chachagüí es una zona árida de vegetación escasa en relación a Obonuco; esta última se caracteriza por ser una zona de tipo bosque lluvioso donde abunda gran variedad de flora, lo cual lleva a inferir que hay mayor disponibilidad de nutrientes en el suelo lo que implica la biosíntesis de alcaloides en mayor concentración; además de esto la zona de Obonuco presenta más competencia para el desarrollo de la planta (otras especies de plantas, insectos y

depredadores) lo cual estimula la formación de alcaloides.¹¹⁸

La gráfica 18 presenta la relación de concentración en mg/g entre los alcaloides comunes de las dos variedades de yerbamora.

Gráfica 18. Comparación de variedades de yerbamora según la concentración de alcaloides en mg/g.



Fuente: Esta investigación.

¹¹⁸ Frischknecht P., Baumann T. Stress induced formation of Purine alkaloids in plant tissue culture of *Coffea arabica*. En: Phytochemistry (1985). vol. 24, p. 2255-2257.

4.9. Recopilación de información de los alcaloides identificados en las muestras de yerbamora

Se realizó una revisión de los alcaloides reportados para la yerbamora en especies originarias de diferentes países y las propiedades biológicas de estos compuestos. Esta información se recopila en las tablas 28 y 29.

Tabla 28. Resumen de alcaloides reportados para yerbamora.

N°	Compuesto	Técnica analítica	Reportado	Referencia
1	5-Metil-2-pirrolidinona	GC-MS	Si (E)	Jasim H (2015) ¹¹⁹
2	3,3-dimetil-2-butanamina	GC-MS	No	
3	2-pirrolidin-metanol	GC-MS	Si (E)	Jasim H (2015)
4	2-(metoximetil)-pirrolidina	GC-MS	No	
5	4-(pirrolidin-2-ilcarbonil)-morfolina	GC-MS	No	
6	3-(2-metilpropil)-pirrolo[1,2]-pirazina	GC-MS	No	
7	Ergocriptina	GC-MS	No	
8	3-(dietilamino)-1,2-propanodiol	GC-MS	No	
9	2-[3-hidroxipropil]-5-pirrolidinona	GC-MS	No	
10	3-bencil-1,4-diaza-2,5-dioxobiciclo-nonano	GC-MS	No	
11	9-Octadecenamida	GC-MS	Si (E)	Jasim H. (2015)
12	Triptamina	LC-MS/MS	Si (E)	Wakhloo J. (1965) ¹²⁰
13	Tiramina	LC-MS/MS	Si (E)	Cai X. (2010) ¹²¹
14	Feniletanolamina	LC-MS/MS	Si (G)	Szopa J. (2001) ¹²²

¹¹⁹ Jasim H., Hussein A., Hameed I., Kareem A. Characterization of alkaloid constitution and evaluation of antimicrobial activity of *solanum nigrum* using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). En: Journal of pharmacognosy and phytotherapy (2015). vol. 7, p. 57-73.

¹²⁰ Wakhloo J. Evidence for indole-3-acetic acid and tryptophan in the shoot of *solanum nigrum* and the effect of potassium nutrition on their levels. En: An international journal of Plant Biology (1965). vol. 65, p. 301-314.

¹²¹ Cai X., Chin Y., Oh S., Kwon O., Ahn K., Lee H. Anti-inflammatory constituents from *solanum nigrum*. En: Bulletin of the Korean Chemical Society (2010). vol. 31, p. 199.

¹²² Szopa J., Wilczyński G., Fiehn O., Wenczel A., Willmitzer L. Identification and quantification of catecholamines in potato plants (*solanum tuberosum*) by GC-MS. En: Phytochemistry (2001).

15	1H-indol-acetamida	LC-MS/MS	Si (E)	Wakhloo J. (1965)
16	Feruloil-tiramina	LC-MS/MS	Si (E)	Cai X. (2010)
17	Brucina	LC-MS/MS	No	
18	Ergotamina	LC-MS/MS	No	
19	Hipaconitina	LC-MS/MS	Si (G)	Kouassi K. (2016)
20	Ajmalicina	LC-MS/MS	Sí (G)	Srivastava M. (2016)
21	Cinchonina	LC-MS/MS	Sí (G)	Srivastava M. (2016)

E= reportados en la especie *Solanum nigrum*

G= reportados en el género *Solanum*.

Fuente: Diversas fuentes.

Tabla 29. Propiedades referenciadas de alcaloides.

N°	Compuesto	Propiedades	Referencia
1	5-Metil-2-pirrolidinona	Antibacterial	Jasim H. (2015)
2	3,3-dimetil-2-butanamina	Cardiovasculares	Chen Y. (2004) ¹²³
3	2-pirrolidin-metanol	Antibacterial	Jasim H. (2015)
4	2-(metoximetil)-pirrolidina	Agente antiarrítmico	Lloyd J. (2010) ¹²⁴
5	4-(pirrolidin-2-ilcarbonil)-morfolina	Precursor de iminas	Ramesh M (2016) ¹²⁵
6	3-(2-metilpropil)-pirrolo[1,2]-pirazina	Inhibidor de aflatoxinas	Yan P. (2004) ¹²⁶
7	Ergocriptina	Antitumoral	Ito A. (1985) ¹²⁷
8	3-(dietilamino)-1,2-propanodiol	Anestésico	Rider T. (1930) ¹²⁸

vol. 58, p. 315-320.

¹²³ Chen Y., Qiu C., Wang H. Cardiovascular pharmacological characterization of novel 2,3-dimethyl-2-butylamine derivatives in rats. En: Life sciences (2004). vol. 75, p. 2131-2142.

¹²⁴ Lloyd J., Finlay H., Vacarro W., *et al.* Pyrrolidine amides of pyrazolodihydropyrimidines as potent and selective K_v 1,5 blockers. En: Bioorganic & medicinal Chemistry Letters (2010). vol. 20, p. 1436-1439.

¹²⁵ Ramesh M. Synthesis and characterization of new Mannich base of 1-(morpholin-4-ylmethyl)-pyrrolidine-2,5-dione (L) with some transition metal complexes. En: International Journal of Pharmacy & pharmaceutical research (2016). vol. 6, p. 230-240.

¹²⁶ Yan P., Song Y., Sakuno E., Nakajima H., Nakagawa H., Yabe K. Cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* Inhibits Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. En: Applied and environmental microbiology (2004). vol. 70, p. 7466-7473.

¹²⁷ Ito A., Kawashima K., Fujimoto N., Watanabe H., Naito M. Inhibition by 2-Bromo- α -ergocriptine and tamoxifen of the growth of an estrogen-dependent transplantable pituitary tumor (MtT/F84) in F344 rats. En: Cancer research (1985). vol. 45, p. 5436, 5441.

¹²⁸ Rider T. Local anesthetics derived from dialkylaminopropanediols and phenylurethans. En: Journal of the American Chemical Society (1930). vol 52, p. 2115-2118.

9	2-[3-hidroxipropil]-5-pirrolidinona	Agente antiarrítmico	Lloyd J. (2010)
10	3-bencil-1,4-diaza-2,5-dioxobiciclo-nonano	Antibacterial/ntoxidante	Devi N. (2012) ¹²⁹
11	9-Octadecenamida	Antibacterial	Jasim H. (2015)
12	Triptamina	Psicofarmacológicas	Shimazu S. (2004) ¹³⁰
13	Tiramina	Cardiovasculares	Broadley K. (2010) ¹³¹
14	Feniletanolamina	Cardiovasculares	Broadley K. (2010)
15	1H-indol-acetamida	Psicofarmacológicas	Shimazu S. (2004)
16	Feruloil-tiramina	Anti-inflamatorias	Cai X. (2010)
17	Brucina	Antitumoral	Qin J. (2012) ¹³²
18	Ergotamina	Antitumoral	Ito A. (1985)
19	Hipaconitina	Anticancerígeno	Kouassi K. (2016)
20	Ajmalicina	Antioxidante	Jaleel C. (2006) ¹³³
21	Cinchonina	Anticancerígeno	Genne P. (1994) ¹³⁴

Fuente: Diversas fuentes.

¹²⁹ Devi N., Wahab F. Antimicrobial properties of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Camellia sinesis*. En: International Journal of Pharma and Bio Sciences (2012). vol. 3, p. 420-427.

¹³⁰ Shimazu S., Miklya I. Pharmacological studies with endogenous enhancer substances: Beta-phenylethylamine, tryptamine, and their synthetic derivatives. En: Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry (2004). vol. 28, p. 421-427.

¹³¹ Broadley K. The vascular effects of trace amines and amphetamines. En: Pharmacology & Therapeutics (2010). vol. 125, p. 363–375.

¹³² Qin, J. Anti-Tumor Effects of Brucine Immune-Nanoparticles on Hepatocellular Carcinoma. En: International Journal of Nanomedicine (2012). vol. 7, p. 369-379.

¹³³ Jaleel C., Gopi R., Lakshmanan G., Panneerselvam R. Triadimefon induced changes in the antioxidant metabolism and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. En: Plant Science (2006). vol. 171, p. 271-276.

¹³⁴ Genne P., Duchamp O., Solary E., Pinard D., Belon J., Dimanche-Boitrel M., Chauffert B. Comparative effects of quinine and cinchonine in reversing multidrug resistance on human leukemic cell line K562/ADM. En: Leukemia Research (1994). vol. 8, p. 160-164.

CONCLUSIONES

1. Se determinó que el mejor método de extracción corresponde a la hidrólisis ácida al encontrar mayor promedio de alcaloides extraídos respecto a los otros dos métodos.
2. Se determinaron las condiciones óptimas de extracción de alcaloides de yerbamora mediante hidrólisis ácida por medio de un diseño experimental de metodología de superficie de respuestas. Se encontró que el tiempo de extracción adecuado son 8 horas de reflujo empleando ácido sulfúrico 2 molar etanolizado.
3. Se concluyó que el desengrase de las hojas es un proceso que no interfiere en el proceso de extracción de alcaloides en la yerbamora. No desengrasar la muestra reduce una etapa en el proceso de extracción lo cual favorece su rendimiento; además del ahorro de tiempo, costos de solventes y mitigación de la contaminación producida por estos mismos.
4. Realizando la comparación por GC-MS y su análisis estadístico se encontraron diferencias en las muestras provenientes de las dos regiones. Se encontraron 25 alcaloides para la variedad de yerbamora proveniente de Obonuco y 21 para la variedad de Chachagüí, de las cuales 16 alcaloides fueron similares para ambas variedades. Respecto a estos 16 alcaloides, su concentración en la variedad proveniente de Obonuco es mayor a la variedad de Chachagüí, siendo las concentraciones respectivas 0,441 y 0,158 miligramos de alcaloides por cada gramo de hojas.
5. El análisis por HPLC-PDA arrojó como resultado 22 picos cromatográficos cuyos espectros UV-Vis fueron similares a los reportados en la literatura para alcaloides. Se identificaron las principales familias de alcaloides presentes en las hojas de *solanum nigrum* la cuales son: esteroidales, indólicos y dihidroindólicos, quinolinas, isoquinolinas y quinolonas 2, 4 sustituidas.
6. En el análisis por LC-MS/MS se identificaron tentativamente 10 alcaloides entre los cuales destaca el alcaloide esteroide solasodina reportado previamente en otros trabajos para la especie *solanum nigrum*. Los alcaloides Ajmalicina, Cinchonina e hipaconitica fueron identificados tentativamente, estos han sido reportados para otras especies del género *solanum*. Los alcaloides Ergotamina y ergocriptina no han sido reportados para la especie *solanum nigrum*.
7. Entre los alcaloides mayoritarios destacan la ergocriptina, triptamina, derivados de la feniletilamina, derivados de la 2-pirrolidinona.

La mayoría de los alcaloides fueron de tipo indólico, sin embargo también se identificaron pirrólicos, quinolinas y el alcaloide esteroideal *solasodina*.

8. Se realizó una revisión bibliográfica sobre las propiedades de los alcaloides identificados, dichas propiedades son anestésicas, antibacteriales, anticancerígenas, anti-inflamatorias, antioxidantes, antitumorales, cardiovasculares y psicofarmacológicas. Estas propiedades hacen de la yerbamora nativa de Obonuco y Chachagüí, una planta con gran potencial a nivel medicinal.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar más muestreos con el fin de aumentar la información de los alcaloides de la yerbamora y su relación con las condiciones agroecológicas. Esto permitiría establecer quimiotipos de esta especie.

Con el fin de ampliar la información sobre el proceso de extracción se recomienda realizar un diseño experimental que incluya puntos estrella en el número de experimentos, por ejemplo concentraciones de ácido extractor mayores a 2 M y menores a 0,5 M.

Respecto a la preparación de la muestra se estableció que no realizar el proceso de desengrase en las muestras vegetales puede afectar la separación de las fases acuosa y orgánica en la etapa de extracción con solventes posterior a la hidrólisis ácida, esto se debe a la formación de una suspensión coloidal correspondiente a ácidos grasos entre otros compuestos interferencia. Esta suspensión puede taponar el embudo en el cual se realice la separación líquido-líquido. Para solucionar esto se recomienda decantar la mayor parte de la fase orgánica, posteriormente filtrar por gravedad la fase acuosa, el remanente de la fase orgánica y la suspensión empleando papel filtro cualitativo y realizando lavados con el solvente orgánico. El filtrado libre del coloide se recibe nuevamente en el embudo de decantación donde se separa la fase orgánica más fácilmente.

En este caso el solvente extractor debe ser cloroformo ya que su densidad es mayor que la del coloide; además se debe emplear solución acuosa de cloruro de sodio al 10% para aumentar la fuerza ionica y separar mejor las tres fases.

Se recomienda el uso de estándares de alcaloides para la identificación y cuantificación de estos compuestos. Sin embargo, debido a la variedad y características de los alcaloides reportados en esta investigación, resultaría un trabajo muy costoso y extenso.

Se recomienda realizar estudios de actividad antioxidante y actividad biológica a los extractos con el fin de potencializar el conocimiento sobre esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Ashaal H. Regeneration, in vitro glycoalkaloids production and evaluation of bioactivity of callus methanolic extract of *Solanum tuberosum* L. En: Fitoterapia (2010). vol. 81, p. 600-606.

Akilan C., Srividhya M., Mohana P., Jeba., S; Sundara M. Comparative analysis of phytochemicals, antibiogram of selected plants in *solanaceae* family and its characterization studies. En: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (2014). vol. 6, p. 946-950.

Aniszewski, T. Alkaloids - secrets of life, alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. En: Elsevier science (2007). p. 73-88.

Anscombe F. The Validity of Comparative Experiments. En: Journal Royal of the Statistical Society (1947). vol. 61, p. 181-211.

Arango G. Alcaloides y compuestos nitrogenados. En: Farmacognosía y fitoquímica. Facultad de química farmacéutica. (2008). p. 13-15.

Arulmozhi V., Krishnaveni M., Karthishwaran K.; Dhamodharan G., Mirunalini S. Antioxidant and antihyperlipidemic effect of *Solanum nigrum* fruit extract on the experimental model against chronic ethanol toxicity. En: Pharmacognosy Magazine (2010). vol. 6, p. 42-50.

Azuola R., Vargas P. Extracción de sustancias asistidas por ultrasonido. En: Tecnología en marcha (2007). vol. 20, p. 30-40.

Bai Y., Lin C., LUO W., Wang Y., Sun C., Jia Q. Simultaneous quantification of four saponins, three alkaloids and three fatty acids in *Solanum nigrum* Linn by HPLC-ELSD. En: Journal of Medicinal Plants Research (2012). vol. 6, p. 3632-3639.

Bartlett M. Properties of Sufficiency and Statistical Tests. En: Proceedings of the Royal Society of London (1937). vol. 160, p. 268-282.

Bernal, H., García M., Quevedo S. Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia: Estrategia nacional para la conservación de plantas. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial e Instituto de Investigación de recursos Biológicos Alexander von Humboldt (2011). p. 141-149.

Bilbao M. Análisis fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío, facultad de ciencias básicas y tecnológicas, programa de química de productos vegetales (1997). p. 83-99.

Blossey E., Budzikiewicz H., Ohashi M., Fodor G., Djerassi C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. Tropane alkaloids. En: Tetrahedron (1964). vol. 20, p. 585-595.

Box G., Wilson K. On the Experimental Attainment of the Optimum Conditions. En: Journal of the Royal statistical society (1951). Vol. 13, p. 30-45.

Broadley K. The vascular effects of trace amines and amphetamines. En: Pharmacology & Therapeutics (2010). vol. 125, p. 363–375.

Cahill M., Caprioli G., Vittori S., James K. Elucidation of the mass fragmentation pathways of potato glycoalkaloids and aglycons using Orbitrap mass spectrometry. En: Journal of mass spectrometry (2010). vol 45, p. 1019-1025.

Cai X., Chin Y., Oh S., Kwon O., Ahn K., Lee H. Anti-inflammatory constituents from *solanum nigrum*. En: Bulletin of the Korean Chemical Society (2010). vol. 31, p. 199.

Cavlovic P., Mankotia M., Pantazopoulos P. Liquid Chromatographic Determination of α -Solasonine in Frozen Green Peas as an Indicator of the Presence of Nightshade Berries. En: Journal of AOAC international (2003). vol. 86, p. 759-763.

Cham B., Daunter B., Evans R. Solamargine and other solasodine rhamnosyl glycosides as anticancer agents. En: Asia Pacific Journal of Pharmacology (1994). vol. 9, p. 113.

Chang A. Tradición y ciencia, una alternativa en la investigación de plantas medicinales. En: Etnomedicina y etnobotánica: avances en la investigación. Universidad Andina Simón Bolívar. (2010). p. 13.

Chen R., Feng L., Li H., Zhang H., Yang F. Two novel oligosaccharides from *Solanum nigrum*. En: Carbohydrate Research (2009). vol. 344, p. 1775-1777.

Chew K., Ng S., Thoo Y., Khoo Z., Wan W., Ho C. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. En: International food research journal (2011). vol. 18, p. 571-578.

Derringer G., Suich R. Simultaneous optimization of several responses. En: Journal of Quality Technology (1980). vol. 12, p. 215.

Devi N., Wahab F. Antimicrobial properties of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Camellia sinensis*. En: International Journal of Pharma and Bio Sciences (2012). vol. 3, p. 420-427.

Ding X., Zhu F., Yang Y., Li M. Purification, antitumor activity in vitro of steroidal glycoalkaloids from black nightshade (*solanum nigrum* L.). En: Food chemistry (2013). vol. 141, p. 1181-1186.

Djilani A., Legseir B., Soulimani R., Dicko A. New extraction technique for alkaloids. En: Journal of the Brazilian Chemical Society (2006). vol. 17, p. 29.

Eanes R., Tek N. Solid-phase microextraction (SPME) followed by On-fiber derivatization of solasodine and solanidine aglicones of steroidal glycoalkaloids. En: Journal of liquid chromatography & related technologies (2014). vol. 31, p. 1132-1146.

Echeverri F. Búsqueda de sustancias bioactivas de plantas de la flora Colombiana. Estructura, actividad y síntesis. En: Etnomedicina y etnobotánica: avances en la investigación. Universidad Andina Simón Bolívar. (2010). p. 157.

Eltayeb A., Al-ansari A., Roddick J. Changes in the steroidal alkaloid solasodine during development of *solanum nigrum* and *solanum incanum*. En: Phytochemistry (1997). vol. 46, p. 489- 494.

Fang S., Shengyu L., Dajun H., Gang C. Effects of glycoalkaloids from *Solanum* plants on cucumber root growth. En: Phytochemistry (2010). vol. 71, p. 1534-1538.

Frischknecht P., Baumann T. Stress induced formation of Purine alkaloids in plant tissue culture of *Coffea arabica*. En: Phytochemistry (1985). vol. 24, p. 2255-2257.

Fonnegra R., Jimenéz S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia (2007). vol. 2, p. 272-275.

Furtado N., Vessecchi R., Tomaz J., Galembeck S., Bastos J., Lopez N., Crotti A. Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). En: Journal of Mass Spectrometry (2007). vol. 42, p. 1279-1286.

Genne P., Duchamp O., Solary E., Pinard D., Belon J., Dimanche-Boitrel M., Chauffert B. Comparative effects of quinine and cinchonine in reversing multidrug resistance on human leukemic cell line K562/ADM. En: Leukemia Research (1994). vol. 8, p. 160-164.

Grabber J. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect

degradability? A review of cell wall model studies. En: Crop Science (2005). vol. 45, p. 820-831.

Gheewala N., Saralaya M., Sonara G., Gheewala T. Phytochemical Evaluation of Total Glycoalkaloid of Dried Fruit of *Solanum Nigrum Linn*. En: Current Pharma Research (2013). vol. 3, p. 1010-1013.

Gogoi B., Zaman K. Phytochemical Constituents of Some Medicinal Plant Species Used in Recipe During 'Bohag Bihu' in Assam. En: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. (2013). vol. 2, p. 30-40.

Gonçalves M., Diniz M., Borba J. Modesto efeito hipolipemiante do extrato seco de berinjela (*Solanum melongena L.*) em mulheres com dislipidemias, sob controle nutricional. En: Brazilian Journal of Pharmacognosy (2006). vol. 16, p. 656-663.

Guo L., Cho Y., Kang S., Lee S., Baek Y., Kim Y. Orthogonal array design for optimizing extraction efficiency of active constituents from Jakyak-Gamcho Decoction, the complex formula of herbal medicines, Paeoniae Radix and Glycyrrhizae Radix. En: Journal of Ethnopharmacology (2007). vol. 113, p. 306-311.

*HICHROM GC-Derivatization reagents. Recuperado de:
http://www.hichrom.com/assets/ProductPDFs/GC/GC_Derivatization_Reagents.pdf

Hismath I., Wan W., Ho C. Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves. En: International food research journal (2011). vol. 18, p. 931-939.

Hoebler C., Barry J., David A., Delort-Laval J. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry (1989). vol. 37, p. 360-367.

Huang H., Syu K., LIN J. Chemical composition of *Solanum nigrum Linn* extract and induction of autophagy by leaf water extract and its major flavonoids in AU565 breast cancer cells. En: Journal of Agricultural & Food Chemistry (2010). vol. 58, p. 8699-8708.

Ito A., Kawashima K., Fujimoto N., Watanabe H., Naito M. Inhibition by 2-Bromo- α -ergocriptine and tamoxifen of the growth of an estrogen-dependent transplantable pituitary tumor (MtT/F84) in F344 rats. En: Cancer research (1985). vol. 45, p. 5436, 5441.

Jainu M., Shyamala C. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum*

nigrum (L.) on experimental ulcers models: Possible mechanism for the inhibition of acid formation. En: Journal of Ethnopharmacology (2006). vol. 104, p. 156-163.

Jaleel C., Gopi R., Lakshmanan G., Panneerselvam R. Triadimefon induced changes in the antioxidant metabolism and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. En: Plant Science (2006). vol. 171, p. 271-276.

Jasim H., Hussein A., Hameed I., Kareem A. Characterization of alkaloid constitution and evaluation of antimicrobial activity of *solanum nigrum* using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). En: Journal of pharmacognosy and phytotherapy (2015). vol. 7, p. 57-73.

Kang J. Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples, Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles. In-Tech open science, Dr. Jeevan Prasain (2012). p. 441-492.

Khuri A., Cornell J. Response Surfaces. Dekker, New York (1987). p. 305.

Kouassi K., Sorokina E., Mamybékova B., Békro Y. UV-Visible spectrophotometric detection of *Solanum aethiopicum* hexanic and n-butanolic excerpts and their anticancer activity monitored by flow cytometry and microscopy . En: Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research (2016). vol. 5, p. 28-39.

Kurt B., Torssell G. Natural Product chemistry. A mechanistic biosynthetic and ecological approach. En: Apotekarsocieteten (1997). vol. 2, p. 348-390.

Larsson C. The use of an "internal standard" for control of the recovery in microdialysis. En: Pharmacology Letters (1991). vol. 49, p. 73-78.

Lancaster J., Mann J. Changes in solasodine content during the development of *Solanum laciniatum* Ait. En: New Zealand Journal of Agricultural Research (1975). vol. 18, p. 139.

Li J., Li Q., Gao D., Han Z., Li K. Antitumor effects of total alkaloids isolated from *Solanum nigrum* in vitro and in vivo. En: Pharmazie (2008). vol. 63, p. 534-538.

Lloyd J., Finlay H., Vacarro W., *et al.* Pyrrolidine amides of pyrazolodihydropyrimidines as potent and selective K_v 1,5 blockers. En: Bioorganic & medicinal Chemistry Letters (2010). vol. 20, p. 1436-1439.

*Mass Bank, high quality mass spectral database. Recuperado de: www.massbank.jp

Mohy-ud-din A., Khan M., Ahmad M., Kashmiri A. Chemotaxonomic value of

alkaloids in *solanum nigrum* complex. En: Pakistan Journal of Botany (2010). vol. 42, p. 653-660.

Moncayo N; Zambrano J. Plantas medicinales utilizadas en las zonas de manejo de la comunidad indígena Monilla Amena (Amazonas). En: Colombia, Universidad y Salud. Ed. Universidad de Nariño (2006). p. 15-33.

Muñoz O., Montes M., Wilkomirsky T. Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. Ed Universitaria. Comité de publicaciones científicas. Universidad Santiago de Chile (2004). p. 273-274.

Nirmal S., Patel A., Bhawar S., Pattan S. Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: Possible role in the treatment of asthma. En: Journal of ethno- pharmacology (2012). vol. 142, p. 91-97.

Ogg A., Rogers B., Schilling E. Characterization of Black Nightshade (*solanum nigrum*) and related species in the United States. En: Weed Science. Vol. 29, p. 27-32.

Patel K., Singh R., Patel D. Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of solasodine: A concise report of current scientific literature. En: Journal of Acute Disease (2013). vol. 2, p. 92-98.

Perez R., Perez J., Garcia L., Sossa M. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. En: Journal of ethnopharmacology (1998). vol. 62, p. 43-48.

Pino V. Extracción y preconcentración micelar. Aplicación a la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de interés medioambiental. Tesis doctoral en química analítica. Universidad de la Laguna. Tenerife, España (2002). p. 32-35.

Qin, J. Anti-Tumor Effects of Brucine Immune-Nanoparticles on Hepatocellular Carcinoma. En: International Journal of Nanomedicine (2012). vol. 7, p. 369-379.

Quattrocchi O., Andrizzi S., Laba R. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. Buenos Aires (1992). p. 14-48.

Rahimi R., Shams M., Abdollahi M. A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for inflammatory bowel disease. En: World Journal of Gastroenterol (2010). vol. 16, p. 4504-4514.

Ramesh M. Synthesis and characterization of new Mannich base of 1-(morpholin-4-ylmethyl)-pyrrolidine-2,5-dione (L) with some transition metal complexes. En: International Journal of Pharmacy & pharmaceutical research (2016). vol. 6, p.

230-240.

Rider T. Local anesthetics derived from dialkylaminopropanediols and phenylurethans. En: Journal of the American Chemical Society (1930). vol 52, p. 2115-2118.

Romero S. Recopilación bibliográfica de *Solanum Nigrum*, L. (Yerbamora). Universidad Veracruzana. Facultad de ciencias químicas (2002). p. 19-22.

Sammani A., Shammaa E., Chehna F. Qualitative and quantitative Steroidal alkaloids of *solanum* species distributed widely in Siria by TLC and HPLC. En: International journal of pharmaceutical sciences review and research (2013). vol. 23, p. 23-27.

Sangster A., Stuart K. Ultraviolet spectra of alkaloids. University of the West Indies, Kingston. En: Chemical reviews (1965). vol. 65, p. 69-130.

Sato Y., Miller H., Mosettig E. Degenration of solasodine En: Journal of the American Chemical Society (1951). vol. 73, p. 207.

Shimazu S., Miklya I. Pharmacological studies with endogenous enhancer substances: Beta-phenylethylamine, tryptamine, and their synthetic derivatives. En: Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry (2004). vol. 28, p. 421-427.

Shokrzadeh M., Azadbakht M., Ahangar N., Hashemi A., Saeedi S. Cytotoxicity of hydro-alcoholic extracts of *Cucurbitapepo* and *Solanum nigrum* on HepG2 and CT26 cancer cell lines. En: Pharmacognosy Magazine (2010). vol. 6, p. 176-179.

Skoog D., Holler F., Nieman T. Principios de análisis instrumental, quinta edición, Ed. McGraw-Hill (2007), p 788-796.

Srivastava M., Sharma S., Misra P. Elicitation Based Enhancement of Secondary Metabolites in *Rauwolfia serpentina* and *Solanum khasianum* Hairy Root Cultures. En: Pharmacognosy magazine (2016). vol. 12, p. 315-320.

Szopa J., Wilczyński G., Fiehn O., Wenczel A., Willmitzer L. Identification and quantification of catecholamines in potato plants (*solanum tuberosum*) by GC-MS. En: Phytochemistry (2001). vol. 58, p. 315-320.

Šutkovic J., Ler D., Gawwad M. In vitro production of solasodine alkaloid in *solanum nigrum* under salinity stress. En: Journal of Phytology (2011). vol. 3, p. 43-49.

*Vademécum colombiano de plantas Medicinales. Ministerio de Protección Social (2008). p. 304.

*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1). International Committee on Harmonization (2005). p. 8-13.

*Validation of chromatographic methods. Center for drug evaluation and research CDER (1994). p. 4-28.

Valdés A., Sullini G., Ibáñez E., Cifuentes A., García-Cañas V. Rosemary polyphenols induce unfolded protein response and changes in cholesterol metabolism in colon cancer cells. En: Journal of Funtional Foods (2015). vol. 15, p. 29-439.

Vásquez C., Bernal H. Plantas medicinales en Colombia: Origen, uso tradicional, eficacia, seguridad y aplicabilidad desde el sistema de salud. En: Rutas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia (2011). p. 61-64.

Visth S., Chatuverdi S. Isolation of Natural Products. En: Current Pharma Research (2012). vol. 2, p. 584-599.

Vogeser M., Parhofer K. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)-technique and applications in endocrinology. En: German society of endocrinology (2007). vol. 9, p. 559-570.

Vokoun J., Řeháček Z. Mass spectra of ergot peptide alkaloids. Czechoslovak academy of Sciences. En: Chemical Communications (1975). vol. 140. p. 1731-1734.

Wang D., Wang S., Du Q., Wang N., Liu S., Wang X., Jiang J. Optimization of Extraction and Enrichment of Steroidal Alkaloids from Bulbs of Cultivated *Fritillaria cirrhos*. En: BioMedical Research International (2014). vol. 1, p. 15.

Wakhloo J. Evidence for indole-3-acetic acid and tryptophan in the shoot of *solanum nigrum* and the effect of potassium nutrition on their levels. En: An international journal of Plant Biology (1965). vol. 65, p. 301-314.

Xia D., Fangshi Z., Yun Y., Min L. Purification, antitumor activity in vitro of steroidal glycoalkaloids from black nightshade (*Solanum nigrum* L). En: Food Chemistry (2013). vol. 141 p. 1181-1186.

Yan P., Song Y., Sakuno E., Nakajima H., Nakagawa H., Yabe K. Cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* Inhibits Aflatoxin production by

Aspergillus parasiticus. En: Applied and environmental microbiology (2004). vol. 70, p. 7466-7473.

Zhao R., Yuan J., Li H., Wang X., Jian T., Lin J. Nonequilibrium hollow-fiber liquid-phase microextraction with in situ derivatization for the measurement of triclosan in aqueous samples by gas chromatography-mass spectrometry. En: Journal of Analytical and bioanalytical chemistry (2007). vol. 387, p. 1911.

ANEXOS

Anexo A. Identificación taxonómica de yerbamora proveniente de Chachagüí



Universidad de Nariño
HERBARIO-PSO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La suscrita directora del **HERBARIO PSO DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO**, certifica que el estudiante **LUIS FELIPE ARTURO PERDOMO**, identificado con cédula de ciudadanía No. **1.020.415.784**, solicitó el servicio de secado e identificación taxonómica para una muestra botánica, la cual contiene la siguiente información:

Nombre común reportado: "Yerbamora"

Lugar de colecta: Municipio de Chachagüí, Vereda el Convento.

Altura sobre el nivel del mar: 1.950 m.s.n.m

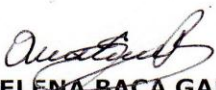
Coordenadas: N 1° 22 25" E 77° 14 33.5"

Fecha de colecta: febrero/ 2016

Una vez revisadas las características morfológicas del ejemplar y comparado con los exsiccados registrados en el Herbario de Investigaciones –HERBARIO PSO–, como única colección vegetal legalmente registrada en el departamento de Nariño, la muestra corresponde a la especie:

***Solanum nigrum* L.**

Se expide a solicitud del interesado, como soporte para el trabajo de grado denominado: "Estudio químico de los alcaloides presentes en las hojas de yerbabamora (*Solanum nigrum* L.) originaria de los municipios de Pasto y Chachagüí" a los tres (03) días del mes de marzo de 2015.


AIDA ELENA BACA GAMBOA
Directora Herbario PSO
Universidad de Nariño

Ciudad Universitaria Torobajo - Laboratorios de Biología - Bloque I - Tel. 731 1449 Ext. 263
email: adminherbario@udenar.edu.co - San Juan de Pasto - Nariño - Colombia



GP-CER 112092

SC-CER 110449

CO-SC-CER 110449

Anexo B. Identificación taxonómica de yerbamora proveniente de Obonuco



Universidad de Nariño
HERBARIO-PSO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La suscrita directora del **HERBARIO PSO DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO**, certifica que el estudiante **LUIS FELIPE ARTURO PERDOMO**, identificado con cédula de ciudadanía No. **1.020.415.784**, solicitó el servicio de secado e identificación taxonómica para una muestra botánica, la cual contiene la siguiente información:

Nombre común reportado: "Yerbamora"

Lugar de colecta: Vereda San Felipe, Obonuco.

Altura sobre el nivel del mar: 3.200 m.s.n.m

Coordenadas: N 1° 11' 47.8" E 77° 19' 28.8"

Fecha de colecta: febrero/ 2016

Una vez revisadas las características morfológicas del ejemplar y comparado con los exsiccados registrados en el Herbario de Investigaciones –HERBARIO PSO-, como única colección vegetal legalmente registrada en el departamento de Nariño, la muestra corresponde a la especie:

***Solanum nigrum* L.**

Se expide a solicitud del interesado, como soporte para el trabajo de grado denominado: "Estudio químico de los alcaloides presentes en las hojas de yerbabamora (*Solanum nigrum* L.) originaria de los municipios de Pasto y Chachagüí" a los tres (03) días del mes de marzo de 2015.


AIDA ELENA-BACA GAMBOA
Directora Herbario PSO
Universidad de Nariño

Ciudad Universitaria Torobajo - Laboratorios de Biología - Bloque I - Tel. 7311449 Ext. 263
email: adminherbario@udenar.edu.co - San Juan de Pasto - Nariño - Colombia



GP-CER 112062

SG-CER 110489

CO-SC-CER 110449

Anexo C. Alcaloides totales identificados por GC-MS en hojas de yerbamora originaria de Chachagüí

N°	Compuesto	t_R	%
1	5-Metil-2-pirrolidinona	4,676	20,2
2	4-formil-1,3-dihidro-1,3-dimetil-2H-imidazol-2-tiona	5,535	3,7
3	4-heptanamina	6,300	4,3
4	3,3-dimetil-2-butanamina	7,020	7,4
5	5-nonilamina	7,730	3,4
6	2-pirrolidin-metanol	8,255	1,3
7	1-metil-2-hidroxi-2-fenil-N,N-dimetil-etilamina	9,280	3,7
8	2-(metoximetil)-pirrolidina	10,440	2,2
9	4-(pirrolidin-2-ilcarbonil)-morfolina	11,630	12,6
10	3-(2-metilpropil)-pirrolo[1,2- α]-pirazina	12,315	3,6
11	Ergocriptina	12,660	10,6
12	3,9-diazatriciclo[7.3.0.0]-dodecan-2,8-diona	12,785	2,2
13	3-(dietilamino)-1,2-propanodiol	14,245	3,2
14	N-Metil-efedrina	14,950	2,0
15	2-[3-hidroxipropil]-5-pirrolidinona	17,170	2,0
16	5-Pirrolidino-2-pirrolidona	18,400	2,5
17	Ácido 4-Pirrolo benzazocina-carboxílico	20,060	2,8
18	3-bencil-1,4-diaza-2,5-dioxobiciclo[4.3.0]-nonano	20,750	7,1
19	5-(3-hidroxibutil)-2-pirrolidinona	22,360	1,5
20	13-docosenamida	26,850	2,0
21	9-Octadecenamina	27,100	1,6

Fuente: Esta investigación.

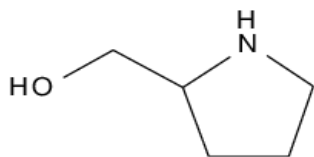
Anexo D. Alcaloides totales identificados por GC-MS en hojas de yerbamora originaria de Obonuco

N°	Compuesto	t_R	%
1	5-Metil-2-pirrolidinona	4,775	19,4
2	4-formil-1,3-dihidro-1,3-dimetil-2H-imidazol-2-tiona	5,595	2,5
3	5-metil-3-Isoxasolamina	6,195	1,9
4	4-heptanamina	6,320	5,5
5	3-amino-2,4-dimetil-pentano	6,540	1,0
6	3,3-dimetil-2-butanamina	7,025	4,3
7	5-nonilamina	7,735	1,9
8	2-pirrolidinametanol	8,255	1,1
9	1-metil-2-hidroxi-2-fenil-N,N-dimetil-etilamina	9,295	4,9
10	(1-Etil-2-metilpropil)-dimetilamina	9,915	1,6
11	2-(metoximetil)-pirrolidina	10,455	1,3
12	4-(pirrolidin-2-ilcarbonil)-morfolina	11,620	9,7
13	3-(2-metilpropil)-pirrolo[1,2- α]-pirazina	12,330	1,8
14	Ergocriptina	12,665	9,1
15	3,9-diazatriciclo[7.3.0.0]-dodecan-2,8-diona	12,800	1,7
16	Benceno-etanamina	14,010	0,9
17	3-(dietilamino)-1,2-propanodiol	14,245	1,6
18	2-metilamino-1-(3,4-metileno-dioxifenil)-butan-1-ona	14,940	1,1
19	2-[3-hidroxipropil]-5-pirrolidinona	17,180	2,2
20	[5-(piperidin-1-carbonil)-1H-imidazol-4-il]-piperidin-1-il-metanona	19,950	3,1
21	Ácido 4-Pirrolo benzazocina-carboxílico	20,090	1,3
22	Ácido 6-oxo-hexahidroazocino[4,5,6]indol-4-carboxílico	20,365	3,5
23	3-bencil-1,4-diaza-2,5-dioxobiciclo[4.3.0]-nonano	20,765	8,5
24	Higrina	22,385	1,6
25	9-octadecenamina	27,085	8,4

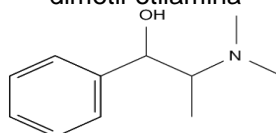
Fuente: Esta investigación.

Anexo E. Estructuras de los alcaloides presentes en las dos variedades de yerbamora

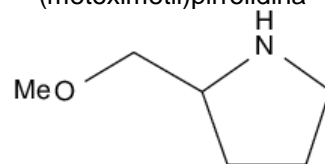
2-Pirrolidin-metanol



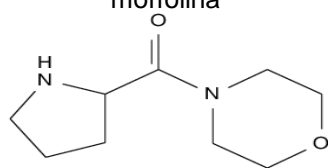
1-metil-2-hidroxi-2-fenil-N,N-dimetil-etilamina



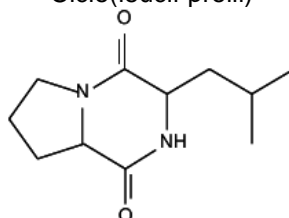
2-(metoximetil)pirrolidina



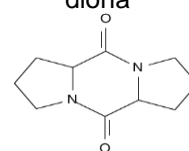
4-(pirrolidin-2-ilcarbonil)-morfolina



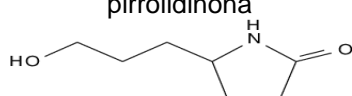
Ciclo(leucil-prolil)



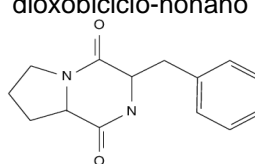
3,9-diazatriciclo-dodecan-2,8-diona



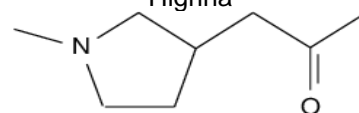
2-(3-hidroxi-3-propil)-5-pirrolidinona



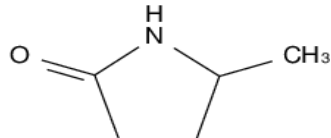
3-bencil-1,4-diaza-2,5-dioxobiciclo-nonano



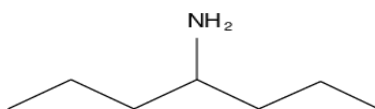
Higrina



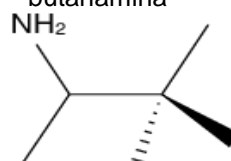
5-metil-2-Pirrolidinona



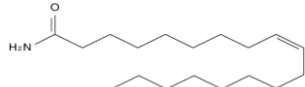
4-Heptanamina



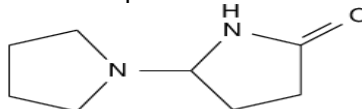
3,3-dimetil-2-butanamina



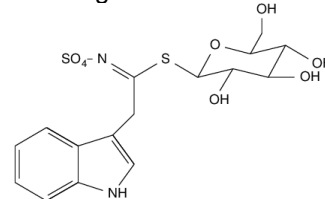
9-octadecenamina

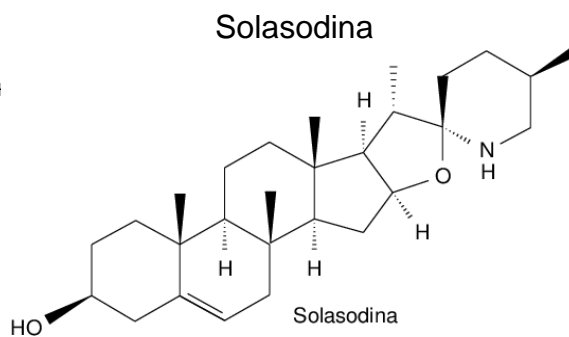
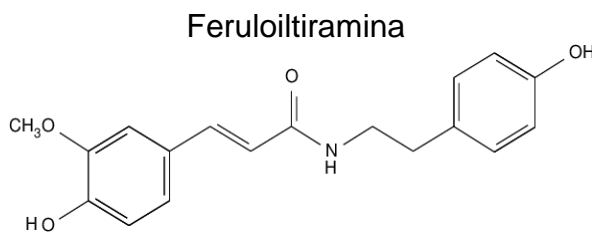
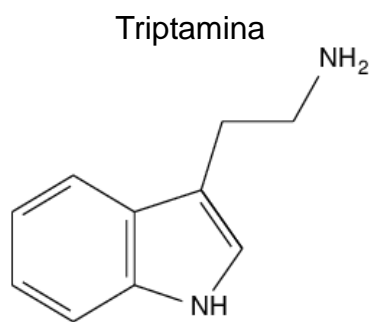
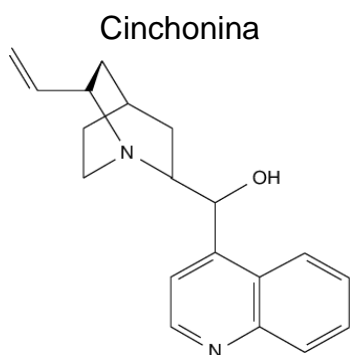
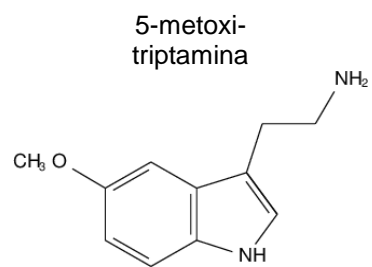
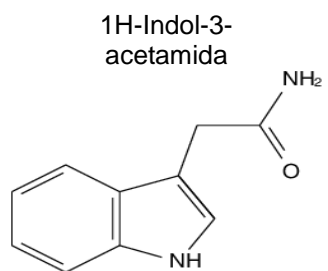
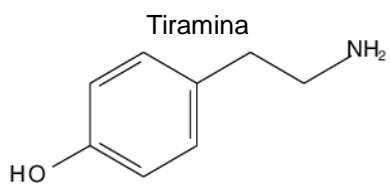


5-pirrolidino-2-pirrolidona



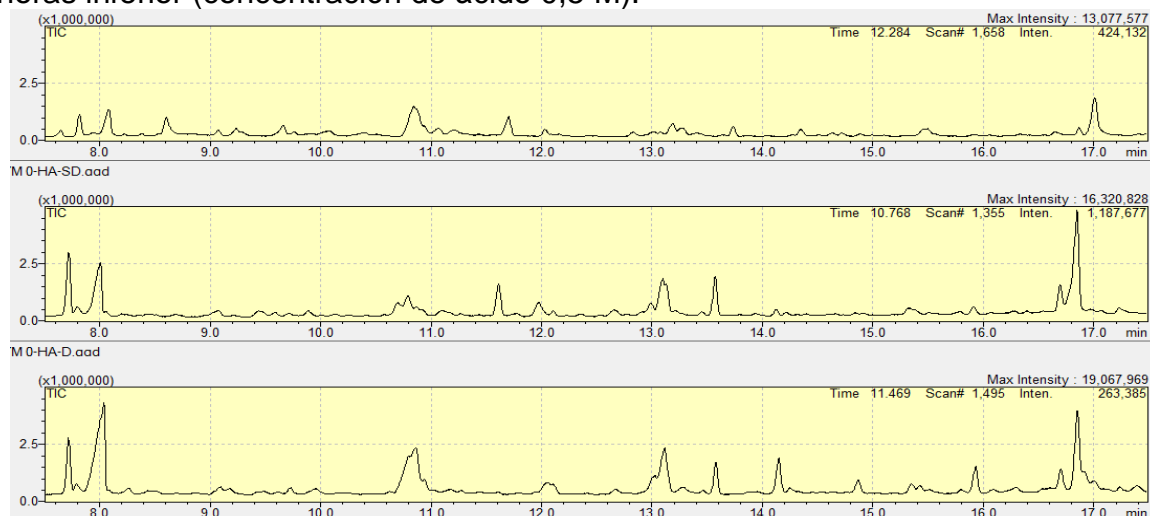
Indolilmetil glucosinolato





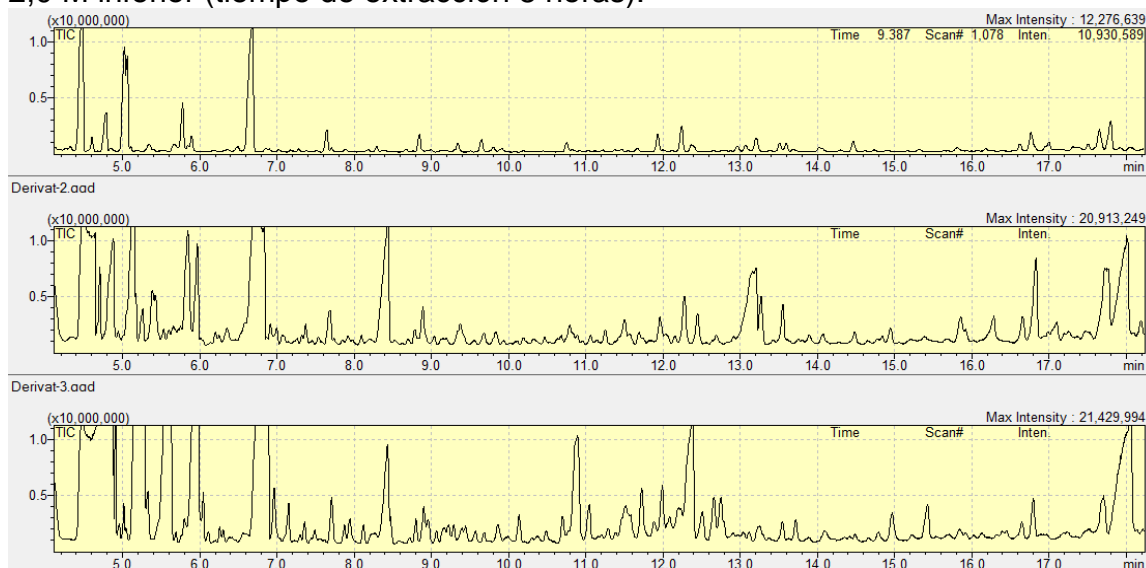
Anexo F. Cromatogramas: GC-MS y HPLC

Cromatogramas comparativos GC-MS de la optimización de las condiciones de extracción en función del tiempo de extracción: 4 horas superior, 6 horas medio, 8 horas inferior (concentración de ácido 0,5 M).



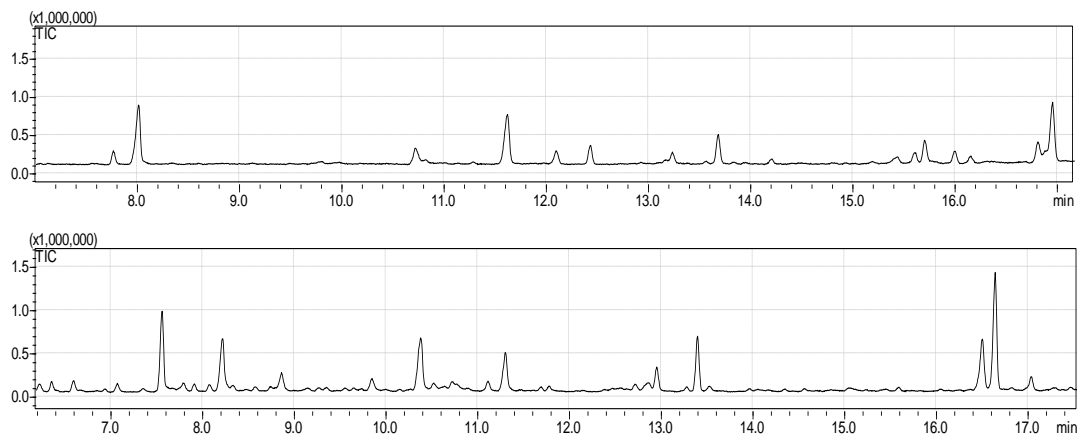
Fuente: Esta investigación.

Cromatogramas comparativos GC-MS de la optimización de las condiciones de extracción en función de la concentración de ácido: 0,5 M superior, 1,0 M medio, 2,0 M inferior (tiempo de extracción 8 horas).



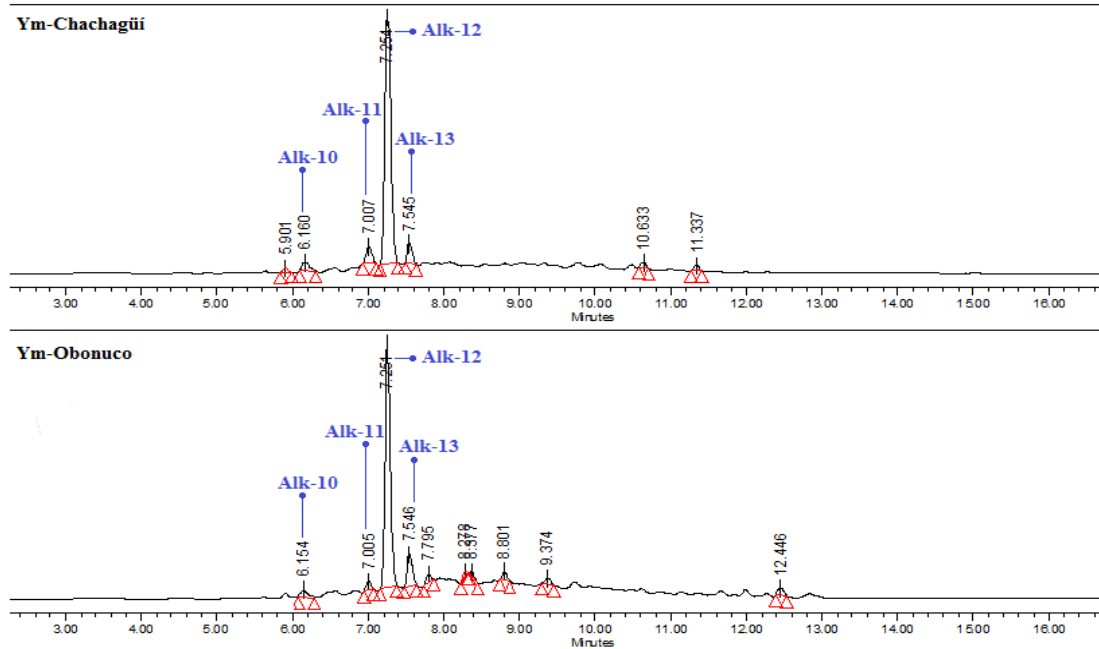
Fuente: Esta investigación.

Cromatogramas comparativos GC-MS de las muestras desengrasadas (superior) y sin desengrasar (inferior).



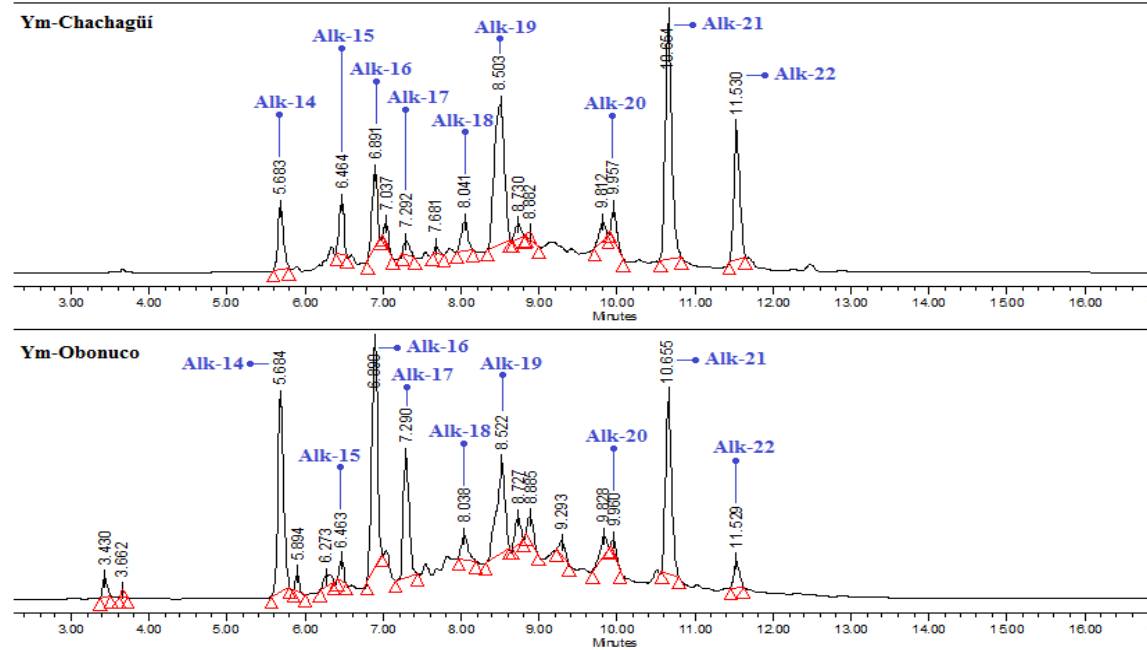
Fuente: Esta investigación.

Cromatogramas HPLC-PDA ($\lambda = 254$ nm).



Fuente: Esta investigación.

Cromatogramas HPLC-PDA ($\lambda = 294 \text{ nm}$).

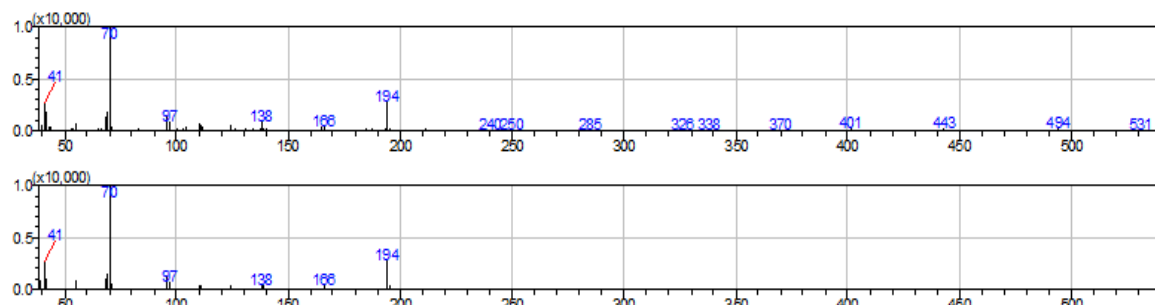


Fuente: Esta investigación.

Anexo G. Espectros de masas por GC-MS y LC-MS/MS de los alcaloides presentes en las dos variedades de yerbamora

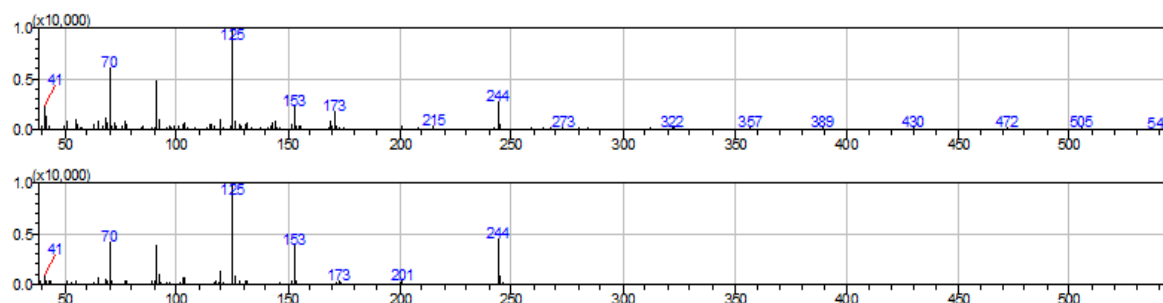
Espectros de masas (superior: muestra; inferior: base de datos):

3,9-diazatriciclo-dodecan-2,8-diona:



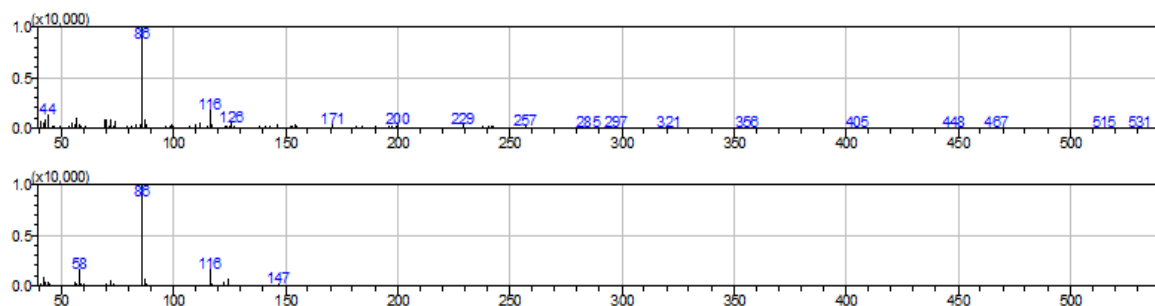
Fuente: Esta investigación.

3-bencil-1,4 diaza-2,5-dioxobiciclo-nonano:



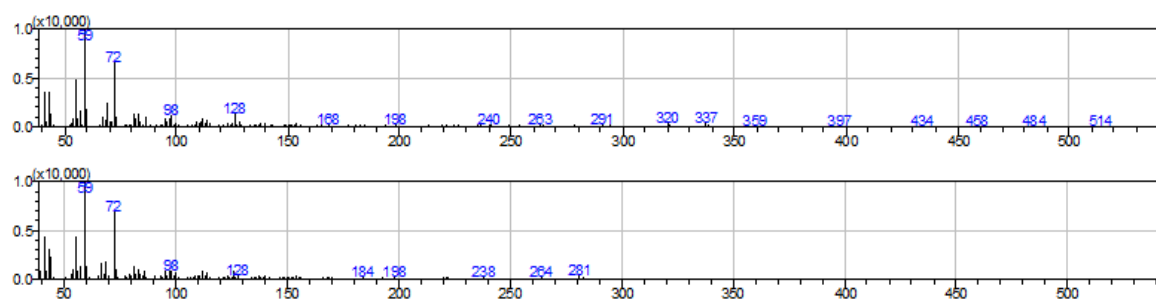
Fuente: Esta investigación.

1,2-propanodiol:



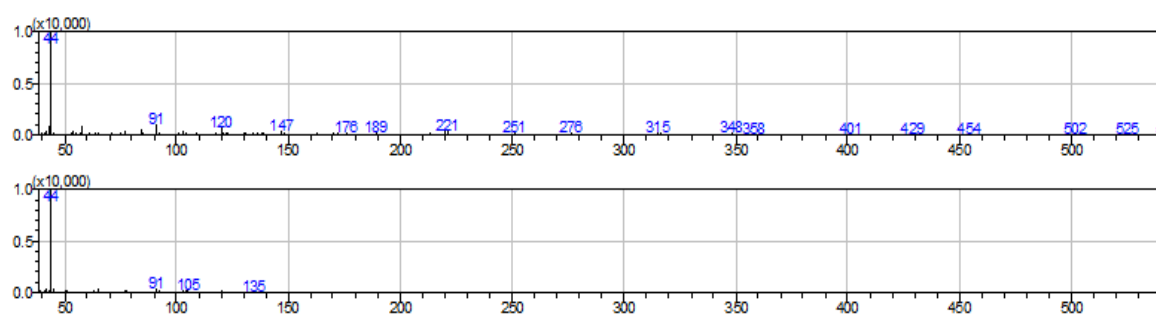
Fuente: Esta investigación.

9-octadecenamina:



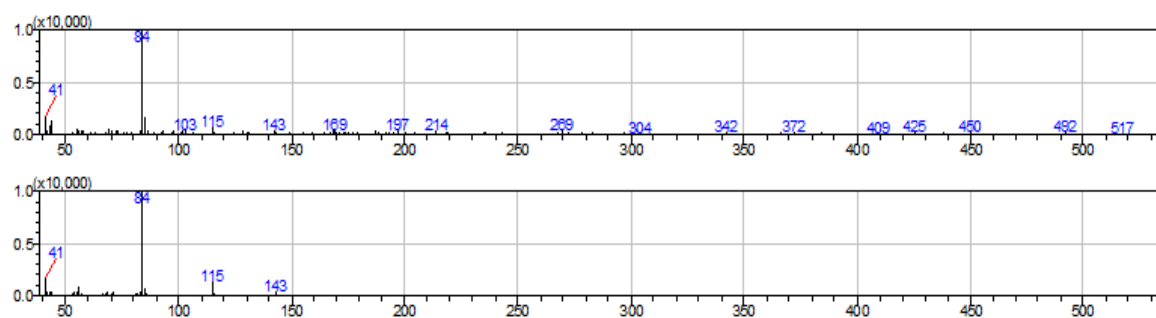
Fuente: Esta investigación.

Bencenoetanamina:



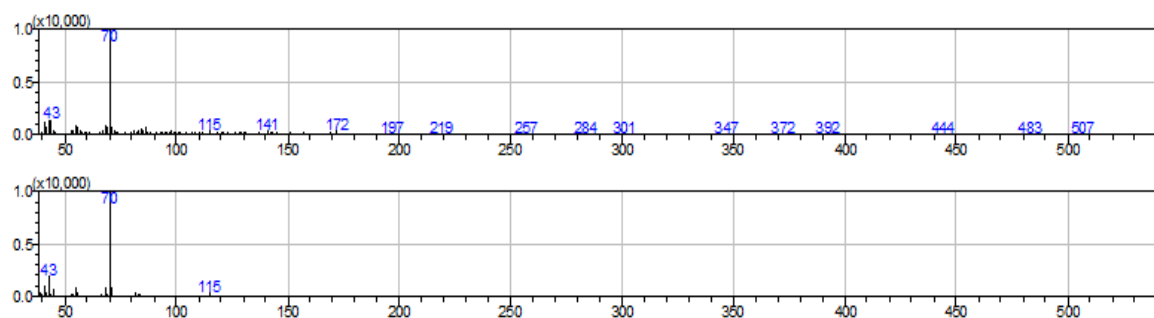
Fuente: Esta investigación.

2-(3-hidroxipropil)-5-pirrolidinona:



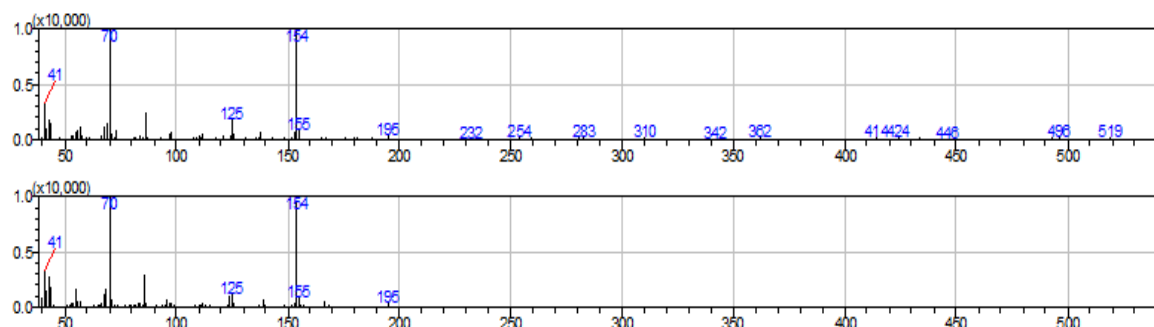
Fuente: Esta investigación.

2-metoximetil-pirrolidina:



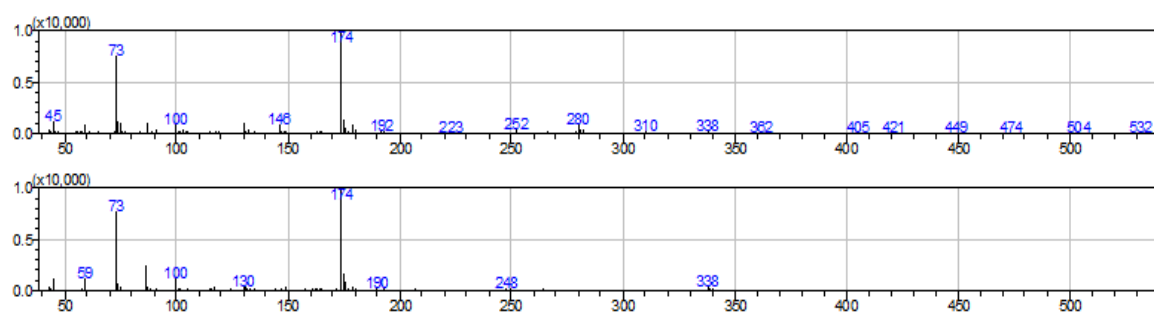
Fuente: Esta investigación.

Ciclo(leucil-proil):



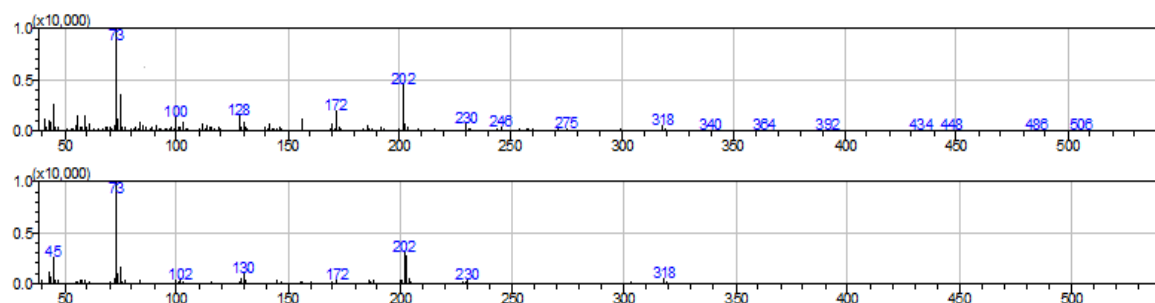
Fuente: Esta investigación.

Tiramina:



Fuente: Esta investigación.

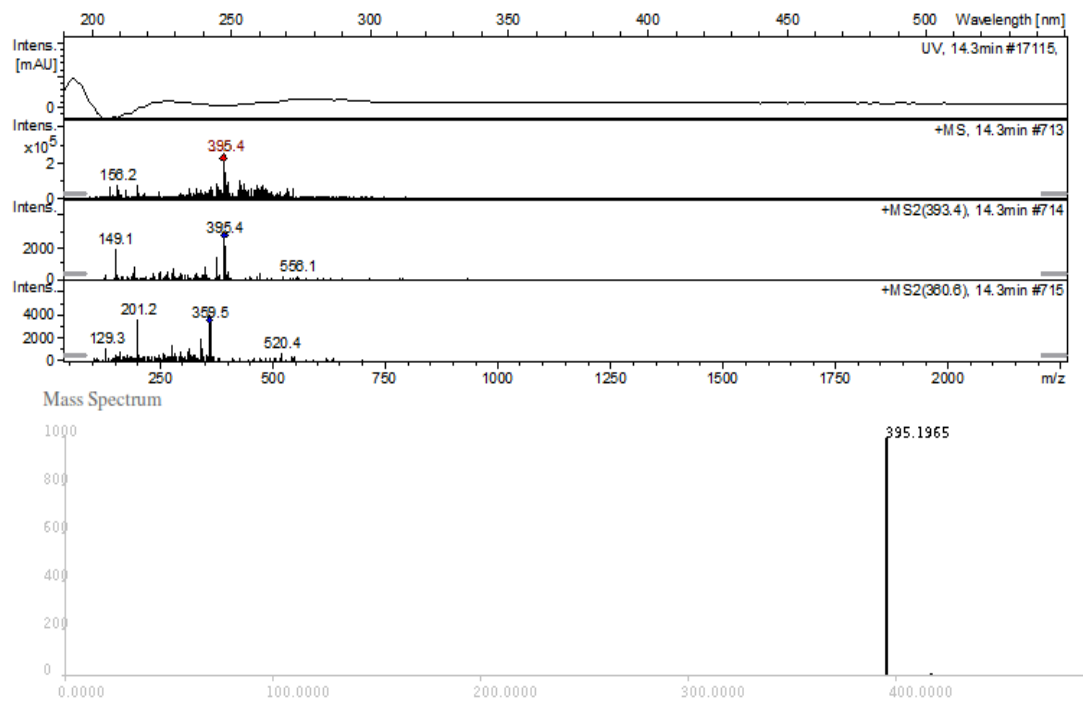
1H-indol-3-acetamida:



Fuente: Esta investigación.

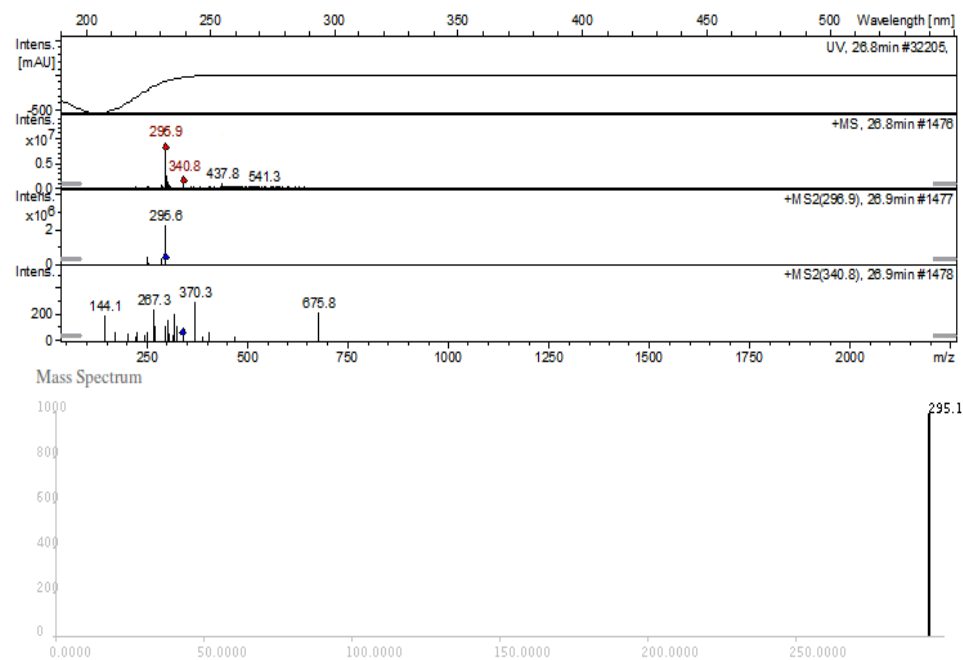
Espectros masas-masas (superior: muestra; inferior: base de datos):

Brucina:



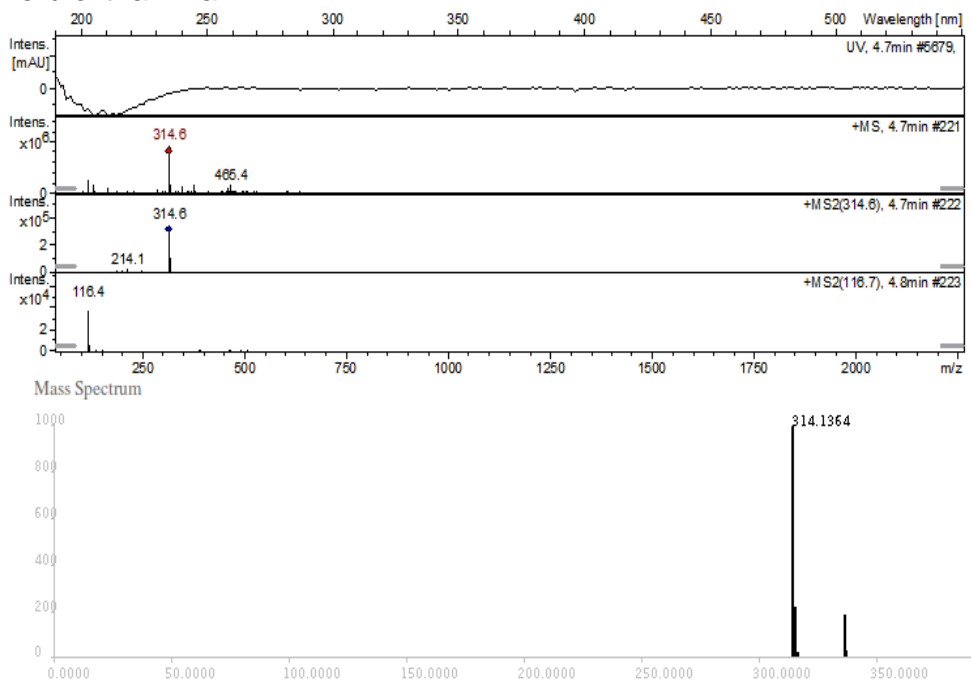
Fuente: Esta investigación.

Cinchonina:



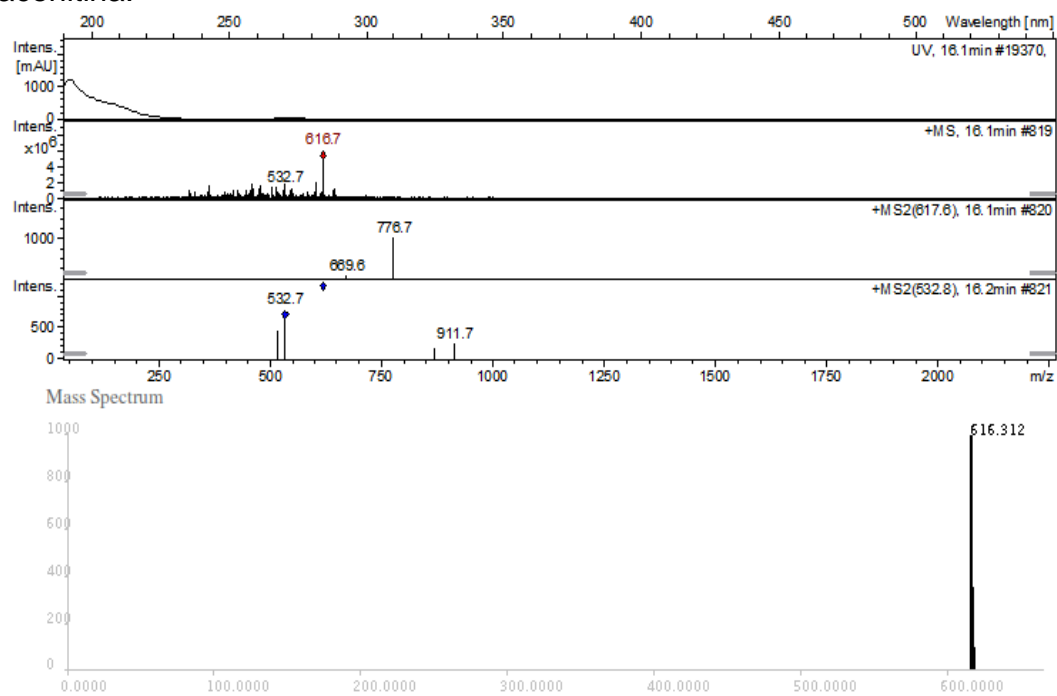
Fuente: Esta investigación.

Feruloiltiramina:



Fuente: Esta investigación.

Hipaconitina:



Fuente: Esta investigación.